

# Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung von Norrin



## DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin der  
Universität Regensburg

vorgelegt von

**Stephanie Anna Leopold**

aus Pfaffenhofen/Ilm

im Jahr 2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:  
27.04.2015

Die Arbeit wurde angeleitet von:  
PD Dr. Andreas Ohlmann

Unterschrift:

Meiner Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1. NDP-Gen und -Protein.....	8
1.2. Norrin-vermittelte Signaltransduktion.....	9
1.3. Funktionen von Norrin.....	13
1.4. Vermittlung des neuroprotektiven Effekts von Norrin.....	15
1.5. Aufbau der Retina.....	17
1.6. Das Glaukom.....	19
1.7. Schadensmodelle der retinalen Ganglienzellen.....	20
1.7.1. Exzitatorische Schädigung mittels NMDA.....	20
1.7.2. Chronisch degenerative Schädigung von retinalen Ganglienzellen in DBA/2J Mäusen.....	22
1.8. Zielsetzung.....	23
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>24</b>
2.1. Materialliste.....	24
2.1.1. Geräte.....	24
2.1.2. Materialien.....	25
2.1.3. Reagenzien.....	27
2.1.4. Enzymkits.....	30
2.1.5. Oligonukleotidprimer.....	30
2.1.6. Antikörper.....	32
2.1.7. Rezepte für Gele, Puffer und Lösungen.....	32
2.2. Gewinnung von rhNorrin aus EBNA-pSNOS Zellen.....	37
2.2.1. Allgemeine Arbeitstechniken der Zellkultur.....	37
2.2.2. Kultivierung der EBNA-pSNOS Zellen.....	39
2.3. In vivo Versuche.....	40
2.3.1. Versuchstiere und Tierhaltung.....	40
2.3.2. Intraperitoneale und intravitreale Injektionen.....	42

---

2.3.3.	Das NMDA-Schadensmodell.....	43
2.3.4.	Das DBA/2J-Mausmodell .....	43
2.3.5.	Gewebepräparation aus der Maus .....	47
2.4.	Molekularbiologische Methoden .....	49
2.4.1.	DNA-Extraktion aus der Maus .....	49
2.4.2.	Polymerase-Kettenreaktion .....	49
2.4.3.	Agarose-Gelelektrophorese.....	52
2.4.4.	RNA-Isolation .....	53
2.4.5.	Quantifizierung der RNA.....	54
2.4.6.	cDNA-Synthese .....	54
2.4.7.	Quantitative real-time RT-PCR .....	55
2.5.	Proteinbiochemische Techniken .....	58
2.5.1.	Aufreinigung von rhNorrin.....	58
2.5.2.	Proteinisolation.....	60
2.5.3.	BCA-Assay .....	61
2.5.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	62
2.5.5.	Western Blot Transfer.....	63
2.5.6.	Nachweis von Proteinen.....	63
2.6.	Histologische Arbeitstechniken .....	66
2.6.1.	Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten .....	66
2.6.2.	Kryoeinbettung und Herstellung von Gefrierschnitten .....	67
2.6.3.	Eponeinbettung und Herstellung von Semidünnschnitten .....	68
2.6.4.	Histologische Färbungen.....	69
2.7.	Mikroskopie.....	74
2.8.	Datenverarbeitung und Statistik.....	74
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>75</b>
3.1	Einfluss von LIF auf die neuroprotektive Wirkung von Norrin .....	75

3.1.1	Phänotypanalyse der LIF-defizienten Mäuse .....	76
3.1.2	Verifizierung der LIF-Defizienz in der Netzhaut .....	77
3.1.3	Analyse des Einflusses von LIF an der neuroprotektiven Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen .....	79
3.1.4	Norrin vermittelt die gesteigerte Gliosereaktion nach akuter Schädigung in der Netzhaut über die Induktion von LIF .....	82
3.1.5	Expressionsanalyse neuroprotektiver Faktoren in der Retina .....	85
3.2	Analyse der neuroprotektiven Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen im DBA/2J-Schadensmodell .....	90
3.2.1	Untersuchung des intraokulären Drucks.....	91
3.2.2	Morphologische Veränderungen in der vorderen Augenkammer .....	92
3.2.3	Analyse der Sehnervenschädigung .....	97
3.2.4	Norrin aktiviert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Retinae von DBA/2J- Mäusen.....	100
3.2.5	Untersuchung der Gliosereaktion .....	102
3.2.6	Expression neuroprotektiver Faktoren.....	104
3.2.7	Aktivierung des pAKT-Signalwegs.....	106
3.2.8	Einfluss auf immunologische Prozesse .....	108
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>112</b>
4.1.	Einfluss von Norrin auf akut geschädigte Ganglienzellen im NMDA-Modell .....	112
4.2.	Einfluss von Norrin auf chronisch geschädigte Ganglienzellen im DBA/2J- Modell.....	119
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>128</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>130</b>
6.1.	Literaturverzeichnis.....	130
6.2.	Abkürzungsverzeichnis .....	142
6.3.	Abbildungsverzeichnis .....	148

---

6.4.	Tabellenverzeichnis .....	150
6.5.	Danksagung.....	152
6.6.	Erklärung .....	154

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. *NDP*-Gen und -Protein

Norrin ist ein sezerniertes Protein, das über die Bindung an Frizzled-4 den klassischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivieren und hierdurch angiogene und neuroprotektive Effekte in der Netzhaut vermitteln kann (Ohlmann & Tamm, 2012). Der für Norrin kodierende *NDP* (*Norrie Disease Pseudoglioma*)-Genlokus umfasst drei Exone und zwei Introns auf einer Länge von 2,7 kb (Meindl *et al.*, 1992). Exon 2 und 3 kodieren für das kleine, aus 133 Aminosäuren bestehende Protein (Chen *et al.*, 1992; Meindl *et al.*, 1992; Berger *et al.*, 1992b). Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten wurde für das erste Exon eine translationsregulierende Rolle angenommen (Meindl *et al.*, 1992), was durch Untersuchungen an Patienten mit Norrie-Syndrom bestätigt werden konnte, deren Mutationen in Exon 1 zu Splice-Defekten führten (Nikopoulos *et al.*, 2010). Das translatierte Protein, das seit 1997 unter dem Namen Norrin bekannt ist (Walker *et al.*, 1997), weist neben einer N-terminalen Signalsequenz eine C-terminale Cystein-reiche Domäne (CRD) auf (Meindl *et al.*, 1992). *In silico* Untersuchungen der Aminosäuresequenz bezüglich seiner Tertiärstruktur deuten auf eine Ähnlichkeit des Proteins mit der TGF $\beta$ -Superfamilie hin (Meitinger *et al.*, 1993). Die konservierte CRD nimmt hierbei eine wichtige Rolle in der Ligand-Rezeptor-Bindung ein (Meitinger *et al.*, 1993). Dies korreliert mit Beobachtungen, dass Mutationen im Cystein-kodierenden Bereich zu schwerwiegenden Ausprägungen des Norrie-Syndroms führen als Defekte in anderen Genabschnitten (Meindl *et al.*, 1992; Berger *et al.*, 1992b). 1997 konnten Perez-Vilar und Hill zeigen, dass Norrin in den Extrazellulärraum sezerniert wird und dort mithilfe von Disulfidbrücken Oligomere bildet. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität zu Proteinen der extrazellulären Matrix ist eine autokrine bzw. parakrine Norrinwirkung wahrscheinlich (Perez-Vilar & Hill, 1997; Ohlmann & Tamm, 2012). Die besonders starke Affinität zu Heparin resultiert dabei in einer verstärkten Ligand-Rezeptor-Bindung (Smallwood *et al.*, 2007; Ohlmann *et al.*, 2010). Das murine *Ndph* (*Norrie disease pseudoglioma homolog*) weist eine 95% Homologie zum humanen *NDP*-Gen auf, welche auf 99% ansteigt, wenn nur der für das Exon 3 kodierende Anteil der Genomsequenz betrachtet wird (Battinelli *et al.*, 1996). Die Analyse von Mausmodellen zur Aufklärung der funktionellen Eigenschaften von Norrin legt nahe, Rückschlüsse auf die Funktion im Menschen machen zu können.

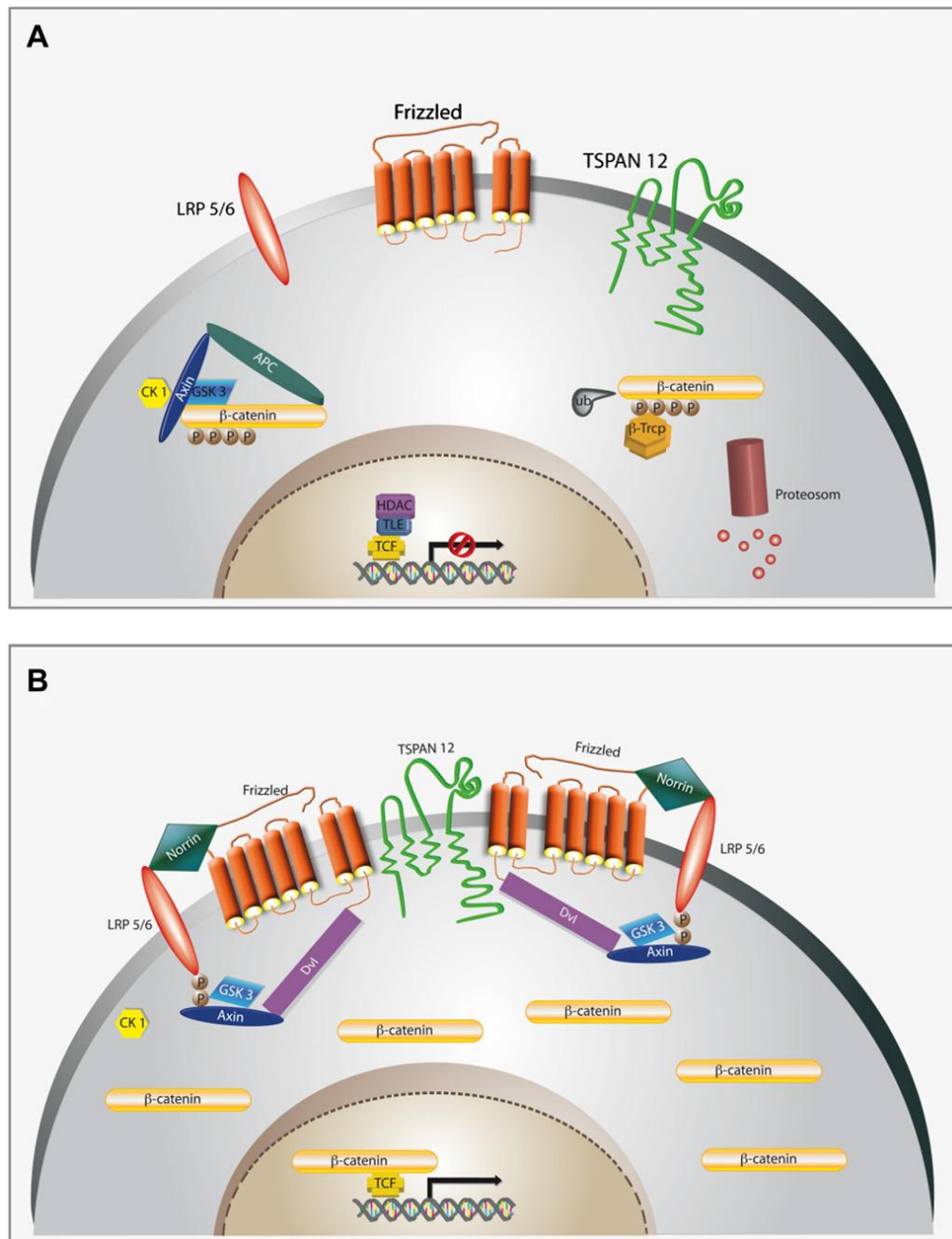


Bisher konnte für verschiedene Gewebe eine Expression von Norrin sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Organismus nachgewiesen werden (Berger *et al.*, 1996). Mittels *in situ* Hybridisierung wurde Norrin in der retinalen Ganglienzellschicht und in der inneren und äußeren Körnerschicht der Retina von Mensch, Maus und Kaninchen detektiert (Berger *et al.*, 1996; Hartzler *et al.*, 1999). Untersuchungen an Mäusen, die eine alkalische Phosphatase unter dem endogenen Norrinpromotor exprimieren (*Ndp*<sup>AP/+</sup>), zeigten jedoch eine spezifische Expression von Norrin in Müllerzellen der Netzhaut (Ye *et al.*, 2009). Dass Norrin lebenslang in der Retina von Mäusen exprimiert wird, konnte durch Lenzer *et al.* bestätigt werden. Northern Blot Analysen zwei Jahre alter Mäuse zeigten ebenso starke Norrin-Signale, wie sie für zwei Wochen alte Tiere beobachtet werden konnten (Lenzner *et al.*, 2002). Desweiteren wurde eine Expression von Norrin in Niere, Lunge, reproduktiven Organen und im Innenohr nachgewiesen (Hsieh *et al.*, 2005; Luhmann *et al.*, 2005a; Ye *et al.*, 2011). Auch in einigen Arealen des Gehirns ist das *Ndp*-Gen aktiv. Während mittels *in situ* Hybridisierungen eine Norrin-Expression in Hippocampus, Cerebellum und Neocortex beobachtet werden konnte (Berger *et al.*, 1996; Hartzler *et al.*, 1999), zeigten Untersuchungen an *Ndp*<sup>AP/+</sup>-Mäusen einzig in Gliazellen Promoteraktivität (Ye *et al.*, 2011). So war eine Norrin-Expression in den Astrozyten des Vorder- und Mittelhirns und in den Bergman-Glia des Cerebellums zu beobachten (Ye *et al.*, 2011).

## 1.2. Norrin-vermittelte Signaltransduktion

Mithilfe von Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass Norrin mit hoher Affinität an den Fzd4 (Frizzled 4)-Rezeptor bindet und hierdurch den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivieren kann (Xu *et al.*, 2004; Smallwood *et al.*, 2007). Die Wnt (Wingless-type MMTV integration site) -vermittelte Signaltransduktion spielt sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus in einer Vielzahl von Prozessen eine wichtige Rolle. So ist sie unter anderem bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen involviert (Logan & Nusse, 2004). Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg vermittelt seine Wirkung dabei über die Regulation von  $\beta$ -Catenin (MacDonald *et al.*, 2009; Dijksterhuis *et al.*, 2014). Im nicht-stimulierten Zustand (vgl. Abb. 1) wird zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin konstant durch einen Degradations-

komplex abgebaut. Dieser ist aus dem Gerüstmolekül Axin, dem Tumorsuppressor APC (Adenomatous polyposis coli), CK1 (Casein kinase 1) und GSK3 (Glykogen synthase kinase 3) aufgebaut.  $\beta$ -Catenin wird dabei von CK1 und GSK3 am N-Terminus phosphoryliert, was eine Ubiquitinierung durch die E3 Ubiquitin-Ligase Untereinheit b-Trcp (beta-Transducin repeat containing protein) zur Folge hat. So markiert wird das Protein anschließend mithilfe des Proteasoms degradiert (He *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 2009; Dijksterhuis *et al.*, 2014). Der kontinuierliche Abbau verhindert letztlich die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, wodurch eine Suppression spezifischer Zielgene durch Mitglieder der TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factor) - Familie gegeben ist (Korinek *et al.*, 1998; MacDonald *et al.*, 2009; Dijksterhuis *et al.*, 2014). Eine Aktivierung des Signalwegs (vgl. Abb. 1) erfolgt durch Bindung eines Liganden (Wnt bzw. Norrin) an einen der Fzd-Rezeptoren und ihren spezifischen Korezeptor LRP5 oder 6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6). Die Bildung des Fzd/LRP5/6-Komplexes führt zu einer Rekrutierung von Dvl (Dishevelled) und daraufhin zu einer Anlagerung des Abbaukomplexes an den Rezeptor und letztlich zu dessen Inaktivierung. Nachfolgend kommt es zu einer Anreicherung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und zu einer Translokation in den Zellkern, wo es durch Bindung an die TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren die Expression der Zielgene induziert (MacDonald *et al.*, 2009). Dass noch ein weiteres Protein den Norrin/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beeinflussen kann, jedoch nicht auf den klassischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg wirkt, konnten Junge *et al.* zeigen (Junge *et al.*, 2009). Mithilfe von TSPAN12 (Tetraspanin 12) können sich Fzd4-Rezeptoren zu Clustern zusammenschließen, was eine Verstärkung des Signalwegs bei Norrinbindung zur Folge hat (Junge *et al.*, 2009). Dass ein Knockout von *Fzd4*, *Lrp5* oder *Tspan12* ähnliche Auswirkungen wie eine Norrin-Defizienz aufweist, konnte im Tiermodell nachgewiesen werden. Mäuse mit einer Defizienz von Norrin, FZD4, LRP5 oder TSPAN12 sind hinsichtlich einer verminderten intraretinalen Angiogenese und fehlender Rückbildung von hyaloiden Gefäßen vergleichbar (Rehm *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004; Luhmann *et al.*, 2005b; Xia *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2009; Junge *et al.*, 2009).

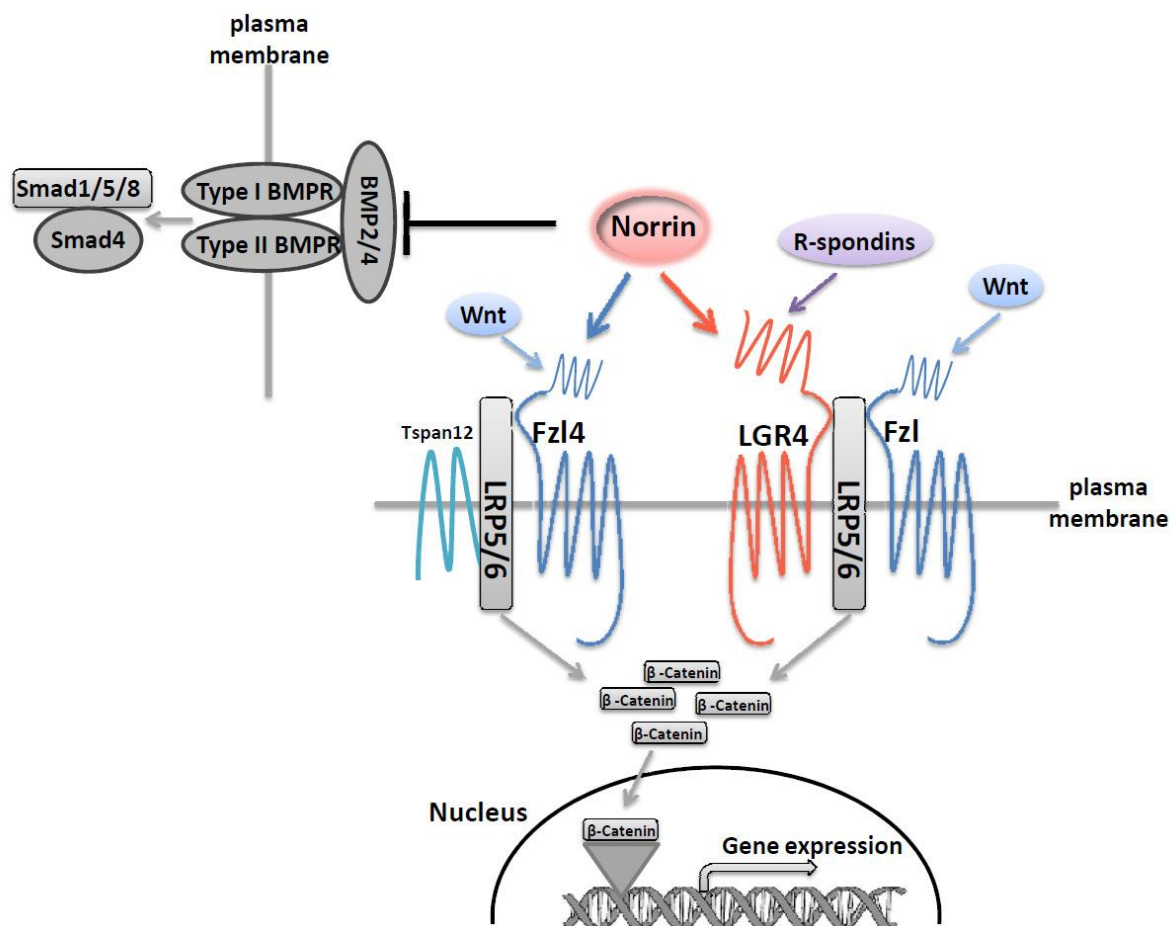


**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Norrin/β-Catenin-Signalwegs**

**A.** Kontinuierlicher Abbau von β-Catenin durch den β-Catenin-Degradationskomplex im nicht-stimulierten Zustand. **B.** Die Bindung von Norrin an Frizzled-4 und LRP5/6 führt zur Anlagerung des Abbaukomplexes an die Membran. Im Zytoplasma akkumulierendes β-Catenin transloziert in den Nukleus, wo es die Expression von Zielgenen induziert. Durch TSPAN12-vermittelte Clusterbildung mehrerer Frizzled/LRP-Komplexe wird eine Verstärkung des Signalwegs ermöglicht. Nach Ohlmann & Tamm (2012).

Norrin bindet hochspezifisch an Fzd4, nicht jedoch an andere Fzd-Rezeptoren (Xu *et al.*, 2004). Die Bindung erfolgt dabei mithilfe der Cystein-reichen Domäne am C-terminalen Ende des Proteins (Hsieh *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011) und ist stark von einer Oligomerisierung abhängig (Junge *et al.*, 2009). Neuere

Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass Norrin neben Fzd4 auch LGR4 (Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4) und BMP2 und 4 (Bone morphogenetic protein 2/4) (vgl. Abb. 2) binden kann und somit als multifunktionaler Ligand agiert (Xu *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013). LGR4 ist wie Fzd4 ein 7-Transmembran-Domänen-Rezeptor (Gordon & Nusse, 2006; Deng *et al.*, 2013) und kann durch Interaktion mit R-Spondin und Wnt3a ebenfalls den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivieren (Xu *et al.*, 2004; Cruciat & Niehrs, 2013). Die direkte Bindung von Norrin an BMP2 bzw. 4 hat hingegen eine Inhibition des TGF $\beta$ -Signalwegs zu Folge (Xu *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013).



**Abbildung 2: Alternative Bindungsstellen von Norrin**

Schematische Darstellung der möglichen Signaltransduktionswege von Norrin. Eine Norrin-vermittelte Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist sowohl durch die Bindung an Fzd4 als auch an LGR4 möglich. Desweiteren kommt es zu einer Inhibition des TGF $\beta$ -Signalwegs, wenn Norrin an BMP2/4 bindet. Nach Deng *et al.* (2013).

### 1.3. Funktionen von Norrin

Um die funktionellen Eigenschaften von Norrin untersuchen zu können, wurden verschiedene Mausmodelle analysiert. Erste Hinweise auf mögliche Funktionen konnten anhand des Phänotyps Norrin-defizienter Mäuse (*Ndp*<sup>-/-</sup>) gewonnen werden (Berger *et al.*, 1996). Zum einen scheint Norrin eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Aufrechterhaltung von Blutgefäßen einzunehmen (Ohlmann & Tamm, 2012). Während der Entwicklung des retinalen Blutgefäßsystems kommt es zunächst zur Ausbildung eines superfiziellen retinalen Gefäßplexus, der sich von der *A. hyaloidea* zur Peripherie hin ausbreitet (Fruttiger, 2007). Mit Rückbildung der Glaskörpergefäße wächst der sich in der Nervenfaserschicht befindliche Plexus in die Netzhaut ein und bildet dort den intermediären und tiefen Gefäßplexus in der inneren bzw. äußeren plexiformen Schicht aus (Fruttiger, 2007). Im Gegensatz dazu zeigen Norrin-defiziente Mäuse weder einen mittleren noch einen tiefen Gefäßplexus (Richter *et al.*, 1998; Rehm *et al.*, 2002; Luhmann *et al.*, 2005b). Die noch verbliebenen Blutgefäße weisen ein fenestriertes Endothel auf, wodurch die Blut-Retina-Schranke nicht mehr aufrechterhalten werden kann (Luhmann *et al.*, 2005b). Zusätzlich kommt es in diesen Tieren zu einer verminderten Rückbildung der Glaskörpergefäße (Richter *et al.*, 1998; Luhmann *et al.*, 2005b). Um im Gegensatz dazu die Auswirkungen einer intraokulären Überexpression von Norrin untersuchen zu können, generierten Ohlmann *et al.* transgene Mäuse, welche ektopes Norrin unter der Kontrolle des lensenspezifischen  $\beta$ B1-Crystallin-Promoters exprimieren (Ohlmann *et al.*, 2005). Durch Kreuzung der beiden Mauslinien konnte der angiogene Phänotyp der *Ndp*<sup>-/-</sup>-Tiere vollständig aufgehoben werden (Ohlmann *et al.*, 2005). Dass Norrin nicht nur für die Ausbildung des Kapillarnetzes, sondern auch für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der inneren Blut-Retina-Schranke essentiell ist, konnte durch Untersuchungen von Wang *et al.* bestätigt werden (Wang *et al.*, 2012). Aufgrund der Tatsache, dass dies mithilfe von konditionellen *Fzd4*-Knockout-Mäusen geschah und auch für konstitutive *Fzd4*<sup>-/-</sup>- und *Lrp5*<sup>-/-</sup>-Tiere ein vergleichbarer angiogener Phänotyp beschrieben wurde, scheint Norrin seinen angiogenen Effekt mithilfe des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs zu vermitteln (Xu *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Mithilfe des ROP-Mausmodells (Retinopathy of Prematurity) konnten Ohlmann *et al.* zeigen, dass Norrin Blutgefäße auch vor hohen Sauerstoff-Dosen schützen kann. So weisen Tiere, die Norrin in der Linse ( $\beta$ B1-

*Norrin*-Mäuse) oder im retinalen Pigmentepithel (*Rpe65-Norrin*-Mäuse) überexprimieren, nach erhöhter Sauerstoffzufuhr signifikant mehr retinale Blutgefäße auf als vergleichbare Wildtypmäuse (Ohlmann *et al.*, 2010). Auch kommt es bei der Rekapillarisation zu einer anatomisch korrekten Ausbildung des Kapillarnetzes, was auf eine verminderte präretinale Neovaskularisation schließen lässt (Ohlmann *et al.*, 2010).

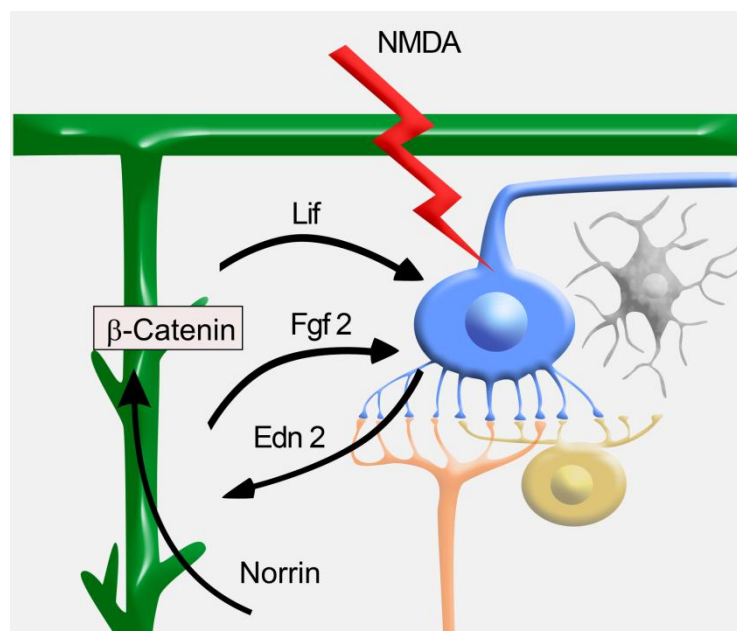
Neben vaskulären Veränderungen konnte jedoch auch ein abnormaler Aufbau der Retina in *Ndp<sup>y/-</sup>*-Mäusen beobachtet werden (Berger *et al.*, 1996). Einige Tiere weisen verlagerte Zellen aus der inneren oder äußeren Körnerschicht in anderen Schichten der Netzhaut auf (Berger *et al.*, 1996; Richter *et al.*, 1998). Auch ein kompletter Verlust der äußeren plexiformen Schicht und der Photorezeptor-Außensegmente war in einigen Tieren feststellbar (Berger *et al.*, 1996). Charakteristisch waren jedoch für alle *Norrin*-defizienten Mäuse eine Desorganisation der Ganglienzellschicht und eine verminderte Anzahl retinaler Ganglienzellen (Berger *et al.*, 1996; Richter *et al.*, 1998). Mithilfe von ERG-Analysen konnte gezeigt werden, dass die pathologischen Veränderungen der Retina zu einem Funktionsverlust und somit zur Erblindung führen (Ruether *et al.*, 1997). Die Auswirkungen des *Ndp*-Knockouts auf die retinalen Neurone wurden zunächst Sekundäreffekten aufgrund mangelnder Blutversorgung der Netzhaut zugeschrieben (Richter *et al.*, 1998; Luhmann *et al.*, 2005b). Untersuchte *βB1-Norrin*-Mäuse zeigten demgegenüber eine erhöhte Proliferationsrate von RGC-Progenitorzellen, welche in einer höheren Anzahl retinaler Ganglienzellen resultierte (Ohlmann *et al.*, 2005). In einer neueren Studie konnte dies bestätigt werden. Durch Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs konnte die Expression von *Norrin* in neuronalen Progenitorzellen der Retina induziert werden, was eine gesteigerte Proliferation dieser Zellen zur Folge hatte (McNeill *et al.*, 2012). Durch die Kreuzung der *βB1-Norrin*-Mäuse mit *Norrin*-defizienten Mäusen konnte auch die Ausprägung der zellspezifischen Veränderungen in der Netzhaut vollständig verhindert werden (Ohlmann *et al.*, 2005). Vermutungen bezüglich eines neuroprotektiven Effekts von *Norrin* wurden durch Untersuchungen an Schadensmodellen bekräftigt. Immortalisierte retinale Ganglienzellen (RGC5), welche durch Staurosporin geschädigt wurden, wiesen nach zusätzlicher Behandlung mit *Norrin* eine deutlich niedrigere Apoptoserate auf (Lin *et al.*, 2009). Auch *in vivo* Studien zeigten ein entsprechendes Ergebnis. So führte eine kombinierte intravitreale Injektion von NMDA und *Norrin* zu einer signifikant höheren

Anzahl überlebender Ganglienzellen als in ausschließlich mit NMDA-behandelten Retinae (Seitz *et al.*, 2010). Auch weisen Mäuse, welche Norrin in den Zellen des retinalen Pigmentepithels überexprimieren, eine erhöhte Überlebensrate von Photorezeptoren nach Lichtschaden auf (Braunger *et al.*, 2013).

#### 1.4. Vermittlung des neuroprotektiven Effekts von Norrin

Durch Untersuchungen von Seitz *et al.* konnte eine neuroprotektive Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen nachgewiesen werden (Seitz *et al.*, 2010). Exzitatorisch geschädigte Neurone der Netzhaut (vgl. 1.7.1) zeigen nach zusätzlicher Behandlung mit Norrin eine verminderte Anzahl apoptotischer Nervenzellen in der retinalen Ganglienzellschicht (Seitz *et al.*, 2010). Da dieser Effekt durch DKK1 (Dickkopf 1), ein Inhibitor der LRP5/6-Korezeptoren, geblockt werden konnte, scheint die Norrin-vermittelte Neuroprotektion durch eine Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs vermittelt zu werden (Zorn, 2001; Seitz *et al.*, 2010). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Norrin die Expression neuroprotektiver Faktoren in NMDA-geschädigten Retinae erhöht (Seitz *et al.*, 2010). Neben *Lif* (Leukemia inhibitory factor) und *Edn2* (Endothelin 2) waren auch gesteigerte Expressionslevel von neurotrophen Wachstumsfaktoren wie *Fgf2* (Fibroblast growth factor 2), *Bdnf* (Brain-derived neurotrophic factor) und *Ledgf* (lens-epithelium-derived growth factor) zu beobachten (Seitz *et al.*, 2010). Durch Inkubation mit Norrin konnte die Expression dieser Faktoren auch in kultivierten Müllerzellen induziert werden (Seitz *et al.*, 2010). Müllerzellen sind retinale Gliazellen, die durch eine Vielzahl von Funktionen die neuronale Homöostase der Netzhaut aufrechterhalten (Bringmann & Reichenbach, 2001). Degenerative Prozesse haben eine Gliosereaktion der Müllerzellen zur Folge (García & Vecino, 2003; Bringmann *et al.*, 2009) und können zur Sekretion von neurotrophen Faktoren führen (Bringmann *et al.*, 2009). Die ebenfalls erhöhten *Gfap* mRNA-Level (Glial fibrillary acidic protein), einem Marker für die Gliosereaktion von Müllerzellen, in NMDA/Norrin-injizierten Retinae weisen auf eine gesteigerte Müllerzellaktivierung durch Norrin hin (Lewis & Fisher, 2003; Seitz *et al.*, 2010). Aufgrund der Tatsache, dass ähnliche Ergebnisse bereits für akut geschädigte Photorezeptoren nachgewiesen werden konnten (Rattner & Nathans, 2005; Joly *et al.*, 2008), entwickelten Seitz *et al.* (2010) eine Hypothese für die

Norrin-vermittelte neuroprotektive Wirkung auf akut geschädigte retinale Ganglienzellen (vgl. Abb. 3): Nach einer akuten Schädigung von RGCs aktiviert Norrin den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen, wodurch die Sekretion von LIF weiter induziert wird. Die geschädigten Ganglienzellen reagieren daraufhin mit einer erhöhten Expression von *Edn2*. Dies führt wiederum in Müllerzellen zu einer weiteren Steigerung der LIF-Produktion. Neben dieser positiven Rückkopplung kommt es zu einer gesteigerten Gliosereaktion, die letztlich in der Sekretion von neurotrophen Wachstumsfaktoren wie FGF2 mündet und zu einer erhöhten Überlebensrate von retinalen Ganglienzellen führt (Seitz *et al.*, 2010).



**Abbildung 3: Postulierter Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von Norrin**

Ganglienzellen werden durch NMDA exzitatorisch geschädigt. Zeitgleich appliziertes Norrin aktiviert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen und steigert hierdurch die Sekretion von LIF. Daraufhin kommt es zu einer gesteigerten Expression von *Edn2* in Ganglienzellen, welche wiederum eine erhöhte Ausschüttung neurotropher Faktoren wie FGF2 zur Folge hat.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Norrin im retinalen Pigmentepithel Photorezeptoren vor einer Licht-induzierten Degeneration schützt (Braunger *et al.*, 2013). Im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren konnte in *Rpe65-Norrin*-Mäusen auch eine erhöhte Expression von *Edn2* und *Bdnf* nachgewiesen werden (Braunger *et al.*, 2013). Dass die neuroprotektive Wirkung von Norrin dabei über eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und eine erhöhte *Edn2* Expression vermittelt wird, konnte mithilfe

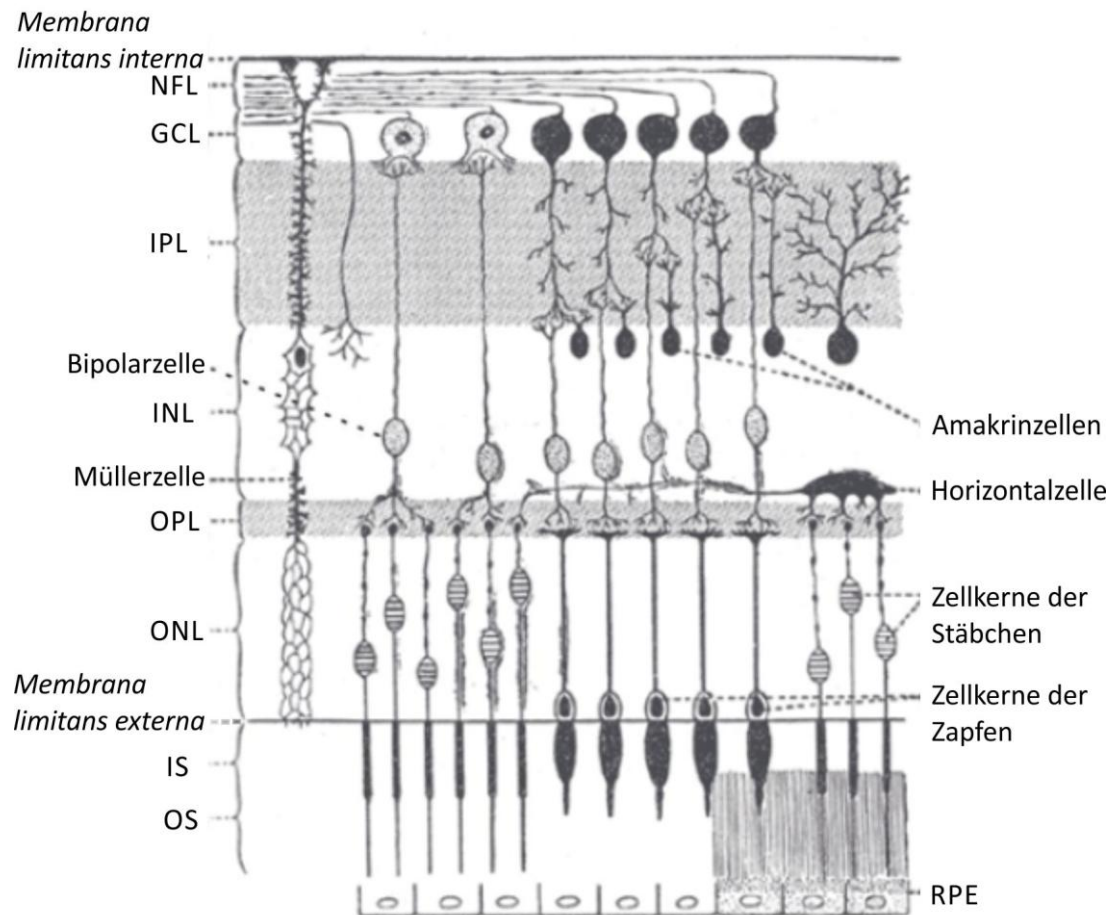


spezifischer Inhibitoren gezeigt werden (Braunger *et al.*, 2013). Desweiteren fanden sich auch gesteigerte pAKT Proteinlevel in den Norrin-überexprimierenden Versuchstieren, was auf eine zusätzliche Aktivierung des AKT-Signalwegs hindeutet (Braunger *et al.*, 2013). Dass auch dieser Signalweg neuroprotektive Effekte vermitteln kann, konnte bereits durch zahlreiche Studien belegt werden (Dudek *et al.*, 1997; Brunet *et al.*, 2001). Die Aktivierung des Signalwegs erfolgt durch Bindung neurotropher Faktoren wie BDNF, IGF1 (Insulin-like growth factor) oder NGF (Nerve growth factor) an einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor und führt durch Rekrutierung von PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) an die Zellmembran zu einer Umwandlung von PIP2 zu PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) (Brunet *et al.*, 2001). Im Anschluss daran kommt es mithilfe von PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase 1) zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung von AKT (Brunet *et al.*, 2001).

## 1.5. Aufbau der Retina

Die Retina stellt zusammen mit dem retinalen Pigmentepithel den sensorischen Anteil des Auges dar. In ihr werden mithilfe der ersten drei Neurone der Sehbahn physikalische Lichtreize in elektrische Signale umgewandelt und anschließend zur primären Sehrinde im Gehirn weitergeleitet (Welsch, 2005). Im Gegensatz zu eversen Augen muss das Licht in inversen Augen der Wirbeltiere erst die anderen Schichten der Netzhaut durchqueren bevor es auf die lichtumwandelnden Photorezeptoren trifft (Fernald, 2000). Bedingt durch die Anordnung der verschiedenen Zelltypen in der Retina, kann diese histologisch in zehn Schichten eingeteilt werden (vgl. Abb. 4, (Lang, 2008)). Von innen nach außen betrachtet wird zunächst der Glaskörper durch die *Membrana limitans interna* von der Netzhaut abgegrenzt, welche zeitgleich als Basalmembran der Müllerzell-Fortsätze dient. Darunter verläuft die Nervenfaserschicht (NFL, nerve fiber layer). Sie enthält die Axone der retinalen Ganglienzellen, welche sich nach dem Austritt aus dem Augapfel zum Sehnerv (*Nervus opticus*) zusammenschließen und bis zum *Corpus geniculatum lateralis* reichen (Campbell, 1997). Die Zellkörper der retinalen Ganglien- und ektopen Amakrinzellen bilden die anschließende Ganglienzellschicht (GCL, ganglion cell layer). Die RGC stellen das 3. Neuron der Sehbahn dar, über die sie in der inneren plexiformen Schicht (IPL, inner plexiform layer) mit Amakrinzellen und

Bipolarzellen der inneren Körnerschicht verschaltet sind. Neben diesen beiden Zelltypen beinhaltet die innere Körnerschicht (INL, inner nuclear layer) auch die Zellkörper der Horizontalzellen und Müllerzellen. Die Bipolarzellen (2. Neuron) agieren als Interneurone, indem sie die Lichtreize von den sensorischen Photorezeptorzellen zu den Ganglienzellen weiterleiten. Amakrinzellen und Horizontalzellen ermöglichen durch horizontale Verschaltung retinaler Nervenzellen eine erste Verarbeitung des Signals (Campbell, 1997). Müllerzellen hingegen sind Gliazellen der Netzhaut, die sowohl durch mechanische Stabilität als auch durch physiologische Prozesse die Homöostase der Neuroretina aufrechterhalten und sich durch die gesamte Netzhaut erstrecken (Bringmann & Reichenbach, 2001). Die äußere plexiforme Schicht (OPL, outer plexiform layer) verbindet die Bipolarzellen mit den Photorezeptorzellen (1. Neuron). Während sich die Zellkörper der Stäbchen und Zapfen in der äußeren Körnerschicht (ONL, outer nuclear layer) befinden, werden die Innen- und Außensegmente (IS, inner segments; OS, outer segments) der Photorezeptoren durch die *Membrana limitans externa* abgegrenzt. Bestehend aus den Fortsätzen der Müllerzellen bildet sie eine siebartige Platte, die von den Photorezeptoren durchquert wird (Lang, 2008). Die als Phototransduktion bezeichnete Umwandlung von Lichtquanten in elektrochemische Impulse findet in den Außensegmenten statt (Wehner *et al.*, 1995). Direkt unterhalb der sensorischen Anteile der Netzhaut liegt das retinale Pigmentepithel (RPE), welches eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen besitzt. Diese reicht von der Regenerierung des Sehfärbstoffes, der Phagozytose von nicht mehr funktionstüchtigen Außensegmenten, über die Expression von neuroprotektiven Faktoren bis zur Bildung der äußeren Blut-Retina-Schranke (Strauss, 2005).



**Abbildung 4: Schichten und Zelltypen der humanen Netzhaut**

Schematische Darstellung der Retina. NFL = Nervenfaserschicht, GCL = Ganglionzellenschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, OS = Außensegmente der Photorezeptoren, RPE = retinales Pigmentepithel. Modifiziert nach Gray und Lewis. (Gray & Lewis, 2000).

## 1.6. Das Glaukom

Unter dem Begriff Glaukom oder Grünem Star werden Augenerkrankungen zusammengefasst, die durch einen progressiven Verlust retinaler Ganglienzellen und einer damit verbundenen Degeneration des Sehnervs gekennzeichnet ist (Quigley, 1996; Foster *et al.*, 2002). Anfänglich auftretende periphere Gesichtsfeldausfälle können letztlich bis zu einem vollständigen Sehverlust führen (Foster *et al.*, 2002). Weltweit stellt das Glaukom die zweithäufigste Ursache für Erblindung dar (Quigley & Broman, 2006). Als Hauptrisikofaktor für das Absterben der retinalen Nervenzellen wird ein erhöhter Augeninnendruck angesehen (Le *et al.*, 2003), welcher aus einem verminderten Kammerwasserabfluss resultiert. Da jedoch ein Glaukom auch bei

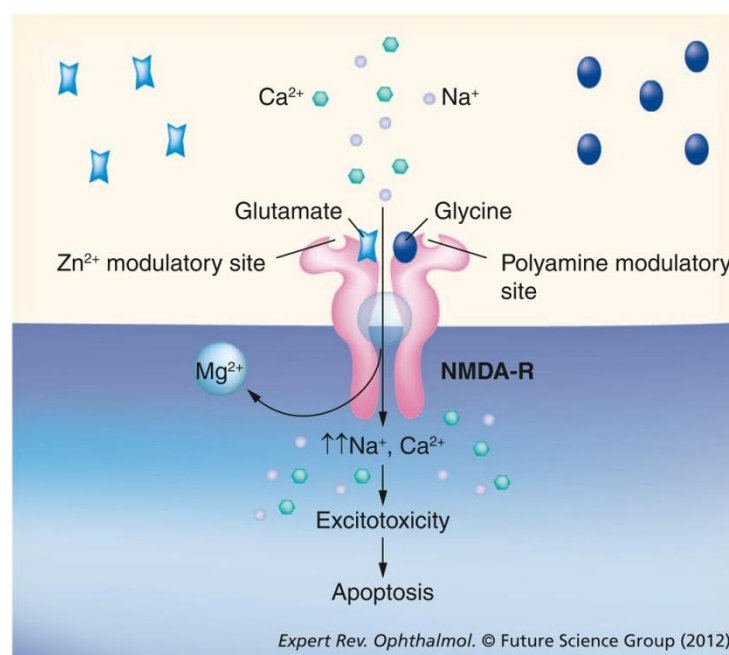
physiologisch normalem Augeninnendruck auftreten kann und ein stark erhöhter intraokulärer Druck nicht notwendigerweise zu einer Schädigung der Ganglienzellen führt (Leske, 1983; Foster *et al.*, 2002), wird ein Zusammenspiel mehrerer ursächlicher Faktoren diskutiert. Bis heute sind die pathophysiologischen Zusammenhänge der Erkrankung nicht vollständig aufgeklärt (Johnson & Tomarev, 2010). Abhängig von der Weite des Kammerwinkels kann eine Einteilung in Offenwinkel-Glaukome, bei der eine Ursache des erhöhten Kammerwasserabflusses nicht auf den ersten Blick erkennbar ist, und Engwinkel-Glaukome vorgenommen werden (Foster *et al.*, 2002; Quigley & Broman, 2006). Eine weitere Untergliederung erfolgt bezüglich der zugrundeliegenden Ursache der Erkrankung. Während beim primären Offenwinkel-Glaukom der Abflusswiderstand im Trabekelwerk ansteigt und hierdurch die retinalen Ganglienzellen druckbedingt degenerieren, ist der Anstieg des intraokulären Drucks beim sekundären Glaukom die Folge anderer Erkrankung oder einer Verletzung des Auges. Mögliche Ursachen können u. a. eine Entzündung des Auges, ein stumpfes Trauma, Veränderungen der Linse oder Neovaskularisationen, wie sie z.B. bei Diabetes mellitus auftreten, sein (Foster *et al.*, 2002). Die häufigste Form des Glaukoms stellt das primäre Offenwinkelglaukom dar (Leske, 1983). Insgesamt betrachtet ist das Glaukom eine heterogene und komplexe Erkrankung, welche nicht nur verschiedene Ursachen und Ausprägungen, sondern auch einen unterschiedlich starken Verlauf in den jeweiligen Augen aufweisen kann (Foster *et al.*, 2002).

## 1.7. Schadensmodelle der retinalen Ganglienzellen

### 1.7.1. Exzitatorische Schädigung mittels NMDA

N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) ist ein synthetisches Glutamat-Analogon, welches ebenfalls an physiologische NMDA-Rezeptoren binden kann (Slaughter, 2010). In Anwesenheit von Glycin führt die irreversible Bindung von NMDA an den Rezeptor zu einer Entfernung des kanalblockierenden Magnesiumions und anschließend zu einem massiven Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle (Lipton, 2006; Basso & Ratan, 2013). Bedingt durch den exzessiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kommt es zur Bildung von toxischen Radikalen, die eine Reihe von proteolytischen Prozessen induzieren und letztlich zur Apoptose der Zelle führen (Lipton, 2006). Der genaue Mechanismus des NMDA-

vermittelten Zelltods konnte jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Shen *et al.*, 2006). Insbesondere neurodegenerative Erkrankungen wie Chorea Huntington, Alzheimer oder Parkinson, aber auch das Glaukom wurden bereits mit einer exzessiven Stimulierung von Glutamat-Rezeptoren in Zusammenhang gebracht (Lipton, 2006; Hardingham & Bading, 2010). In der Retina werden NMDA-Rezeptoren von retinalen Ganglienzellen und Amakrinzellen exprimiert (Shen *et al.*, 2006). Untersuchungen an Mäusen konnten zeigen, dass es nach intravitrealer Injektion von NMDA zu einem deutlichen Anstieg apoptotischer Ganglienzellen in der Retina kommt (Li *et al.*, 1999). Der Effekt der NMDA-vermittelten exzitatorischen Schädigung ist dabei dosisabhängig (Li *et al.*, 1999). Aufgrund der Tatsache, dass nur Zellen, die den entsprechenden Rezeptor exprimieren, durch NMDA geschädigt werden können, stellt die intravitreale Injektion von NMDA ein gutes Modell für eine akute Schädigung von retinalen Ganglienzellen dar und wird deshalb als Modell für ein Glaukom verwendet.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der NMDA-Rezeptor vermittelten Apoptose**

Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptors und seiner Bindungspartner. Das Magnesiumion, welches im inaktiven Zustand den Ionenkanal blockiert, wird durch Bindung von Glutamat oder eines entsprechenden Analogons an den Rezeptor verdrängt. Der NMDA-vermittelte überschießende Ca<sup>2+</sup>-Influx induziert anschließend den apoptotischen Zelltod. Zur Aktivierung des Rezeptors ist Anwesenheit von Glycin notwendig. NMDA-R = NMDA-Rezeptor. Nach Shih und Calkins (Shih & Calkins, 2012).

### 1.7.2. Chronisch degenerative Schädigung von retinalen Ganglienzellen in DBA/2J Mäusen

DBA/2J-Mäuse stellen eine Möglichkeit dar, die Auswirkungen einer chronisch progredienten Degeneration retinaler Ganglienzellen zu untersuchen (Libby *et al.*, 2005b). Aufgrund zweier rezessiv-vererbter Mutationen in den Genen *Gpnmb* (Glycoprotein (transmembrane) nmb) und *Tyrp1* (Tyrosinase-related protein 1) kommt es zu einer Atrophie des Irisstromas und zu einer Irispigmentdispersion (Chang *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2002). Im Laufe der Zeit entwickeln DBA/2J-Mäuse einen erhöhten intraokulären Druck (IOP), der letztlich einen chronischen Verlust von retinalen Ganglienzellen induziert und somit den Veränderungen bei einem Glaukom (Grüner Star) sehr nahe kommt (John *et al.*, 1998; Schuettauf *et al.*, 2004; Libby *et al.*, 2005b). Der verminderte Kammerwasserabfluss, der sich durch die Anreicherung des Irispigments im Kammerwinkel und einer zusätzlichen Verlegung des Kammerwinkels ergibt, wird als Ursache des erhöhten Augeninnendrucks angesehen (John *et al.*, 1998). Der erhöhte intraokuläre Druck induziert eine Degeneration von retinalen Ganglienzellen, die vermutlich durch eine druckbedingte Schädigung der Axone am Sehnervenkopf beginnt (Anderson *et al.*, 2002; Howell *et al.*, 2007). Das in DBA/2J-Mäusen auftretende Sekundärglaukom ist mit dem Pigmentdispersionsglaukom beim Menschen vergleichbar (Libby *et al.*, 2005a). GPNMB und TYRP1 sind beide transmembrane Proteine des Melanosoms, deren Mutation zu einer Freisetzung zytotoxischer Nebenprodukte der Melaninproduktion in das Irisgewebe führt (Chang *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2002). Zusätzlich wird *Gpnmb* jedoch auch in immunaktiven dendritischen Zellen exprimiert (Shikano *et al.*, 2001). Dass DBA/2J-Mäuse eine milde, jedoch chronische Entzündung zeigen und die Ausprägungen des Dispersionsglaukoms durch Substitution *Gpnmb*-exprimierender Zellen abgeschwächt werden konnten, wurde von Mo *et al.* beschrieben (Mo *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die durch den immunologischen Phänotyp der DBA/2J-Mäuse hervorgerufene Entzündungsreaktion zu einer verstärkten Irisatrophie und somit zu einer stärkeren Ausprägung des Dispersionsglaukoms führt (Libby *et al.*, 2005a). Die physiologischen und strukturellen Veränderungen innerhalb der Augen sind altersabhängig und stark variabel, wodurch DBA/2J-Mäuse ein geeignetes Modell zur Untersuchung des humanen Glaukoms darstellen (Libby *et al.*, 2005b) und aufgrund dessen für die Analysen in vorliegender Arbeit verwendet wurden.

## 1.8. Zielsetzung

Eine neuroprotektive Wirkung von Norrin konnte durch vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Exzitatorisch geschädigte Retinae, welche zusätzlich mit Norrin behandelt wurden, wiesen eine deutlich höhere Anzahl retinaler Ganglienzellen auf als vergleichbare Kontrolltiere (Seitz *et al.*, 2010). Dies ging unter anderem mit einem Anstieg der *Lif*-, *Edn2*- und *Fgf2*-Expression einher (Seitz *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit sollte mithilfe von LIF-defizienten Tieren die Rolle von LIF in der Norrin-vermittelten Neuroprotektion im NMDA-Schadensmodell untersucht werden. Desweiteren sollte der Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung detaillierter analysiert werden.

Erste Untersuchungen eines weiteren Tiermodells wiesen darauf hin, dass Norrin seine neuroprotektive Wirkung auch bei chronischer Degeneration retinaler Ganglienzellen entfaltet. So zeigten Norrin-überexprimierende DBA/2J-Mäuse (*Pax6-Norrin*-Mäuse) einen niedrigeren Anstieg des Augeninnendrucks und eine tendenziell höhere Anzahl von Axonen im *N. opticus* als wildtypische Geschwistertiere. Durch Fortführung der Analysen sollten diese Ergebnisse bestätigt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, auf welchem Weg der neuroprotektive Effekt von Norrin in diesem Tiermodell vermittelt wird.

Im Einzelnen sollte untersucht werden,

1. welchen Stellenwert LIF in der Vermittlung des neuroprotektiven Effekts von Norrin bei akuter Schädigung retinaler Ganglienzellen durch NMDA einnimmt.
2. ob die neuroprotektive Wirkung im exzitatorischen Schadensmodell über eine erhöhte Expression von EDN2 und FGF2 vermittelt wird.
3. ob Norrin auch im chronischen DBA/2J-Schadensmodell eine neuroprotektive Wirkung auf degenerierende retinale Ganglienzellen aufweist
4. über welche Mechanismen die potentielle Neuroprotektion in DBA/2J-Mäusen vermittelt wird.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Materialliste

#### 2.1.1. Geräte

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Einbettautomat EM TP (Epon)	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Einbettautomat HMP110 (Paraffin)	Microm International, Walldorf
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Safe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
IKA combimag RET Heizplatte	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Innova 4200 Inkubator shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System + iCycler	BioRad, München
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kern PJL 2100-2M Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Kryo-Einfriergerät	Nunc, Roskilde, DEN
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Memmert Wärmeschrank	Memmert GmbH, Schwabach
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International, Walldorf
Mikrohomogenisator	Roth, Karlsruhe
Mikroskop Axio Imager. Z1, mit ApoTome Zusatzmodul	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	TechnoStar, Deutschland
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA



Model 45-101-i Class II Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop 2000c	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetman Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Macroman <sup>TM</sup>	Gilson, Den Haag, Niederlande
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Power Gen 125 Dispergiergerät	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Power Supply	Consort, Turnhout, BEL
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Roller mixer SRT2 stuart®	Bibby Scientific Limited, Staffordshire , UK
Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stemi 2000-CS Binokular	Zeiss, Göttingen
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grödig, AUT
Supercut 2050	Reichert-Jung, Kirchseeon
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wittenburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
TonoLab Tonometer	Tioloat Oy, Helsinki, FIN
Transilluminator	Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch
Ultracut E-Ultramikrotom	Reichert-Jung, Kirchseeon
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.2. Materialien

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Materialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
3MM Blottin (Whatman)-Papiere	Neolab, Heidelberg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
BD microlance Kanülen	BD, Franklin Lakes, New York, USA
Deckgläser, 24 x 60mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Embedding cassettes	Simport, Beloeil, Kanada

Embedding rings	Simport, Beloeil, Kanada
EasyFlasks Nunclon™ Δ T75	Nunc, Roskilde, DEN
Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott, Roth VWR
Hamiltonspritze 25µl	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitrile	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, DEN
Küvetten	Schott, Mainz
Liquid Blocker PAP-Pen	SCI Science Services, München
Microseal® 'B' Film	Biorad, München
Multidishes Nunclon™ Δ 24-well	Nunc, Roskilde, DEN
Multi-Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Nadel (beveled needle 34 G)	W.P.I., Berlin
Ohrmarken	Hauptner & Heberholz, Solingen
Omnifix sterile Einmalspritzen	Braun, Wertheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR Plates, 96 well iCycler IQ	Biorad, München
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Polypropylen Chromatographiesäulen	Biorad, Hercules, USA
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
PVDF Western Blot Membran	Roche, Mannheim
Reagenz-Reservoir	Biologix, Shangdong, CHN
Spectra Pov7 Dialyseschlauch MWCO 2000	Spectrum Medical Industries, Houston, USA
SuperFrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tissue Culture Plate 96 well	Sarstedt, Nürnberg

### 2.1.3. Reagenzien

**Tabelle 3: Liste der eingesetzten Reagenzien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
10 x PCR-Puffer	Bioline, Luckenwalde
1,4-Paraphenylendiamin	Sigma, Taufkirchen
2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol (DPM-30)	Roth, Karlsruhe
2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydrid (DDSA)	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose NEEO RotiGarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10% (w/v)	Roth, Karlsruhe
Azur II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BC Assay Reagenz A+B	Interchim, Wörl, AUT
Borat (Natriumtetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck, Darmstadt
CDP-Star	Roche, Mannheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie® Brillant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP	Bioline, Luckenwalde
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DMEM	PAA, Pasching, AUT
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Epon	Serva, Heidelberg
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Fetales Kälber Serum (FBS)	Life Technologies, Paisley, UK

Ficoll	Serva, Heidelberg
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelantine	Sigma, Taufkirchen
GeneRuler® 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Geneticindisulfat G418	Roth, Karlsruhe
Gentamycin (5mg/ml)	Life Technologies, Paisley, UK
Glutaraldehyd, 25% in Wasser	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycidether	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidin-HCl	Roth, Karlsruhe
Heparin-Agarose (aqueous ethanol solution)	Sigma, Taufkirchen
Heparin-Natrium 25000 I.E. / 5 ml	Ratiopharm, Ulm
Hygromycin B in PBS (50mg/ml)	Life Technologies, Paisley, UK
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Ketamin	WDT, Garbsen
Luminata Forte Western HRP	Millipore Corporation, Billerica, USA
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (-6H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylnadicanhydrid MNA	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N',-Tetraethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat, Pentahydrat	Sigma, Taufkirchen
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	Sigma, Taufkirchen
Nonidet P-40 (Tergitol)	Sigma, Taufkirchen
Oligonukleotid-Primer	Life Technologies, Paisley, UK
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Paraffin	Engelbrecht, München
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen
PBS	Life Technologies, Paisley, UK
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Paisley, UK
peqGold TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Mix M	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Quercetin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamidlösung mit 0,8% Bisacrylamid 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (HCL)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Staurosporin	ALEXIS Biochemicals, Farmingdale, USA
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwoude, NED

Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland, USA
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Life Technologies, Paisley, UK
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser Rotisolv (RNase-frei)	Roth, Karlsruhe
WST-1 Reagenz	Roche, Mannheim
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Xylencyanol FF	Roth, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

#### 2.1.4. Enzymkits

**Tabelle 4: Verwendete Enzyme und Reagenzienkits**

Bezeichnung	Bezugsquelle
HotMaster™ Taq DNA Polymerase	5Prime, Hilden
qScript™ cDNA Synthesis Kit	Quanta, Gaithersburg, USA
Taq DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Dead-End TUNEL Assay	Promega, Mannheim

#### 2.1.5. Oligonukleotidprimer

Alle aufgeführten Primer wurden von Life Technologies (Paisley, UK) bezogen.

**Tabelle 5: Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer**

Primer	Species	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
<b>Genotypisierung</b>			
LIF	Mus musculus	fwd rev	cgcctaacatgacagacttcccat aggcccctcatgacgtctatagta
neo LIF (LIF ko)	Mus musculus	fwd rev	ccagctcttcagcaatatcacggg cctgtccggtgccctgaatgaact

rd1	Mus musculus	fwd	tgacaattactcctttccctcagtctg
		rev 1 (WT)	taccaccccttctaattttctcagc
		rev 2 (Mut)	gtaaacagcaagaggctttattgggaac
rd8 (Crb1)	Mus musculus	fwd 1(WT)	gtgaagacagctacagttctgatc
		fwd 2 (Mut)	gccctgtttgcatggaggaaactt ggaagacagctacagttctct
		rev	gccccatttgcacactgatgac
SV40	Mus musculus	fwd	gtgaaggaaccttacttctgtggtg
		rev	gtccttgggggtcttctacctttctc

**quantitative RT-PCR**

BDNF	Mus musculus	fwd	agtctccaggacagcaaagc
		rev	tgcaaccgaagtatgaaataacc
EDN2	Mus musculus	fwd	acctcctccgaaagctgag
		rev	tttctgtcacctctggctgta
FGF2	Mus musculus	fwd	cggctctactgcaagaacg
		rev	tgcttgagttgtagtttgacg
GFAP	Mus musculus	fwd	acagactttctccaacctccag
		rev	ccttctgacacggatttgggt
GNB2L	Mus musculus	fwd	tctgcaagtacacgggccag
		rev	acgatgatagggttgctgct
IGF1	Mus musculus	fwd	caaaagcaccgcgtcta
		rev	tcgatagggacggggact
iNOS	Mus musculus	fwd	gggctgtcacggagatca
		rev	ccatgatggtcacattctgc
LIF	Mus musculus	fwd	aaacggcctgcatctaagg
		rev	agcagcagtaagggcacaat
TNF $\alpha$	Mus musculus	fwd	tcttctcattcctgcttggtg
		rev	ggctctgggccatagaactga

### 2.1.6. Antikörper

**Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primärantikörper</b>	
rabbit-anti-AKT	Abcam (Epitomics), Cambridge, UK
rabbit-anti-pAKT	Abcam (Epitomics), Cambridge, UK
rabbit-anti- $\beta$ -Catenin	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
HRP-konjugierte rabbit-anti-GAPDH	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
rabbit-anti-GFAP	Dako, Glostrup, DEN
goat-anti-IBA1	Wako Chemicals GmbH, Neuss
<b>Sekundär- &amp; Tertiärantikörper</b>	
Biotin-konjugierte goat-anti-rabbit	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Cy3-konjugierte goat-anti-rabbit	Dako, Glostrup, DEN
HRP-konjugierte goat-anti-rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Alexa Fluor® 488-konjugiertes Streptavidin	Life Technologies, Paisley, UK

### 2.1.7. Rezepte für Gele, Puffer und Lösungen

**Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Gele**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Agarosegel	1 g Agarose 100 ml 1x TBE 3 $\mu$ l Ethidiumbromid (vor dem Gießen zugeben)
1 ml Sammelgel (SDS-Gel)	0,68 ml H <sub>2</sub> O dest. 0,17 ml Rotiphorese® Gel 30 0,13 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,01 ml 10 % SDS 0,01 ml 10 % APS 0,001 ml TEMED



5 ml Trenngel 10 % (SDS-Gel)	1,9 ml H <sub>2</sub> O dest. 1,7 ml Rotiphorese® Gel 30 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,002 ml TEMED
5 ml Trenngel 15 % (SDS-Gel)	1,1 ml H <sub>2</sub> O dest. 2,5 ml Rotiphorese® Gel 30 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,002 ml TEMED

Tabelle 8: Zusammensetzung der eingesetzten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,1 M Phosphatpuffer (PhP)	P1: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O: 35,6 g auf 2 l P2: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1H <sub>2</sub> O: 13,8 g auf 1 l P1:P2 = 5:1 pH 7,4
1,0 M Tris/HCl (pH 6,8)	121,14 g Tris ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.; pH 6,8
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	181,71 g Tris ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.; pH 8,8
10 % SDS-Lösung	10g SDS ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O dest.
10x Elektrodenpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O dest. lösen

10x PBS	80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 14,4 g Natriumhydrogenphosphat 2,4 g Kaliumhydrogenphosphat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest., pH 7,4; autoklavieren
10x TBE	108 g Tris 55 g Borat 40 ml 0,5 M EDTA ad 1l mit H <sub>2</sub> O dest.; pH 8
10x TBS	30 g Tris 80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid mit HCl auf pH 7,4 (20 °C) einstellen ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.; autoklavieren
10x Transferpuffer	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Methanol 3,7 ml 10 % (w/v) SDS ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.
1x TBST	100 ml 10x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20 ad 1l mit H <sub>2</sub> O dest.
20x SSC	175,3 g Natriumchlorid 88,2 g Natriumcitrat mit HCl auf pH 7,5 (20 °C) einstellen ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 g PFA 100 ml PhP unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4

4x Auftragspuffer für Agarosegel	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 15 % (w/v) Ficoll
4x SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,3 M DTT bzw. 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol
Cacodylat-Puffer	10,7 g Cacodylsäure in 0,5 l H <sub>2</sub> O pH 7,2
Coomassie-Entfärbelösung	500 ml Methanol 10 ml Essigsäure ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen
Coomassie-Färbelösung	40 ml Methanol 2 ml Essigsäure 0,2 g Coomassie®Brillant Blue R-250 ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen
Einfriermedium	5 ml DMSO 10 ml FBS 35 ml DMEM 4500
EM-Fixans	2,5 % Paraformaldehyd 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
Entwicklungslösung	25 g Natriumcarbonat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. 20 $\mu$ l Formaldehyd (pro 50 ml) kurz vor dem Gebrauch zugeben
Fixierlösung I	400 ml Ethanol 100 ml Essigsäure ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.

Fixierlösung II	300 ml Ethanol 68 g Natriumacetat 2 g Natriumthiosulfat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. 0,25 ml Glutaraldehyd (pro 50 ml) kurz vor dem Gebrauch zugeben
Gebrauchslösung (Richardson)	1 Teil Stammlösung I 1 Teil Stammlösung II 2 Teile H <sub>2</sub> O dest.
Konservierungslösung	300 ml Ethanol 40 ml Glycerin ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.
Proteinase K-Lysepuffer	50 mM Kaliumchlorid 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 2 mM Magnesiumchlorid 0,1 mg/ml Gelatine 0,45 % Nonidet P-40 0,45 % Tween 20 Proteinase K (500 µg/ml)
Methylenblau-Lösung	0,03 % (w/v) Methylenblau 0,3 M Natriumacetat pH 5,2
Paraphenylendiamin	500 mg Paraphenylendiamin 50 ml Ethanol
Silberlösung	2,5 g Silbernitrat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. 40 µl Formaldehyd (pro 50 ml) kurz vor dem Gebrauch zugeben
Stammlösung A (Epon)	62 ml Glycidether 100 100 ml DDSA

Stammlösung B (Epon)	100 ml Glycidether 100 89 ml MNA
Stammlösung I (Richardson)	5 g Azur II 500 ml H <sub>2</sub> O dest.
Stammlösung II (Richardson)	5 g Methylenblau 500 ml 1 % Borax (Natriumtetraborat)
Stopplösung	15 g EDTA-Dinatriumsalz ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.
Waschpuffer für Proteinisolation	0,3 M Guanidin-HCL 95 % Ethanol

## 2.2. Gewinnung von rhNorrin aus EBNA-pSNOS Zellen

### 2.2.1. Allgemeine Arbeitstechniken der Zellkultur

Sämtliche Arbeiten im Zusammenhang mit kultivierten Zellen wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Kunststoffmaterialien waren steril verpackt. Die genutzten Glaswaren wurden vor Gebrauch autoklaviert, verwendete Lösungen und Puffer sterilfiltriert. Für alle Zellkultur betreffenden Arbeiten wurde die Hera Safe Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) genutzt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in speziellen Brutschränken (Hera Cell 150, Heraeus, Hanau) bei konstanter Temperatur und CO<sub>2</sub>-Konzentration in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre. Zur kontinuierlichen Versorgung der Zellen mit Nährstoffen wurde das jeweilige Kulturmedium 3x wöchentlich gewechselt.

### 2.2.1.1. Splitten von Zellen

Hatten die Zellen aufgrund fortdauernder Zellteilung Konfluenz erreicht, wurden sie durch Splitten auf mehrere neue Gefäße aufgeteilt. Dafür wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Entfernen des Mediums
- 3x waschen der Zellen mit PBS
- Inkubation mit 0,05% Trypsin/EDTA für 3-5 min im Brutschrank zum Ablösen der adhärenen Zellen
- Abstoppen des Trypsinverdaus durch Zugabe von serumhaltigen Medium
- Überführung der Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß
- Zentrifugation für 5 min mit 1000 UpM
- Resuspension des Zellpellets mit serumhaltigen Medium
- Verteilung der Zellen auf mehrere Zellkulturgefäße und Zugabe von weiterem Medium zur Kultivierung

### 2.2.1.2. Lagerung von Zellen

Nach Abschluss der durchgeführten Versuche oder bei Erreichen einer zu hohen Zellzahl bestand die Möglichkeit Zellen zum Zweck der späteren Verwendung zu lagern. Hierfür wurden sie in flüssigen Stickstoff konserviert. Um Zellschäden beim Einfrieren vorzubeugen, wurden die Zellen mithilfe eines mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfriergeräts (Nunc, Roskilde, DEN) langsam und schrittweise auf -80°C (-1°C pro min) herunter gekühlt, bevor sie in den Stickstofftank überführt wurden. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

- Pelletieren der Zellen wie in 2.2.1.1 beschrieben
- Lösen des Pellets in 1 ml Einfriermedium (vgl. Tabelle 8)
- Überführung der Zellsuspension in Kryoröhrchen
- Einsatz des Kryoröhrchens in Einfriergerät und Lagerung bei -80°C ü.N. zur langsamen Temperatursenkung
- Überführung der Röhrchen in flüssigen Stickstoff zur langfristigen Lagerung

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen zunächst in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen, wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit serumhaltigen Medium auf 10 ml aufgefüllt und für 5 min mit 1000 UpM zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Zellpellet mit 10 ml Medium resuspendiert und auf eine 75 cm<sup>2</sup> fassende Zellkulturflasche (EasyFlasks Nunclon™) ausgesät.

### 2.2.2. Kultivierung der EBNA-pSNOS Zellen

Zur Gewinnung von rekombinatem humanen Norrin wurden von PD Dr. Andreas Ohlmann EBNA-pSNOS Zellen zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um immortalisierte HEK-293 EBNA Zellen, die stabil mit dem Expressionsvektor pSNOS (vgl. Abb. 6) transfiziert wurden (Ohlmann *et al.*, 2010). Bei der Generierung dieses Vektors wurde die Sequenz von humanem Norrin (cDNA) - ausschließlich des terminalen Signalpeptids - in einen pSecTag2-Vektor eingefügt. Das endogene Signalpeptid wurde durch eine Ig κ-Signalsequenz ersetzt, wodurch es zu einer höheren Sezernierungsrate von rhNorrin in den extrazellulären Raum kam. Um das Protein später identifizieren zu können, wurde das 3'-Ende der Norrin-Sequenz mit 6xHis- und c-myc-cDNA versehen. Die für die Transfizierung verwendeten HEK-293-Zellen („Human Embryonic Kidney cell clone 293“) tragen das EBNA-1 Gen („Epstein-Barr nuclear antigen 1“), wodurch eine extrachromosomale Replikation der Plasmide und deren stabile Verteilung bei der Zellteilung ermöglicht wird.

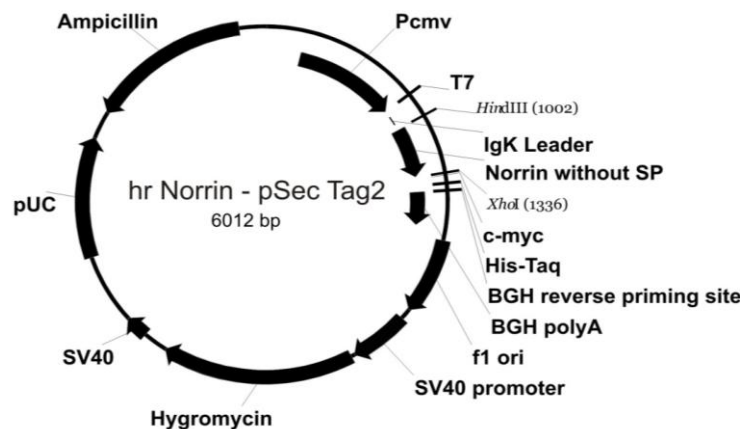


Abbildung 6: Schematische Darstellung des pSNOS Expressionsvektors

Die Kultivierung der transfizierten EBNA-Zellen erfolgte als konventionelle Monolayer in dreikammerigen Zellkulturflaschen („triple flasks“) mit einem speziellen serumhaltigen Zellmedium (vgl. Tabelle 9). Zur Gewinnung des rekombinanten Norrins wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit serumfreiem Medium kultiviert. Nach 3-tägiger Inkubation bei 37°C wurde der Zellüberstand abgenommen und die Zellen wieder mit serumhaltigem Medium versorgt. Der geerntete Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung (s. 2.5.1.1) bei 4°C gelagert. Waren die Zellen für die Langzeitkultivierung bestimmt, verblieben sie nach jeder Proteinernte für mindestens vier Tage in serumhaltigem Medium.

**Tabelle 9: Medium und Kulturbedingungen der EBNA-pSNOS Zellen**

<b>Zelllinie</b>	<b>Zusammensetzung des Mediums</b>	<b>Bedingungen</b>
EBNA-pSNOS Zellen	500 ml DMEM +GlutaMaxII 25 ml FCS 3 ml Hygromycin B 2,5 ml G418 1 ml Gentamycin	37°C 7% CO <sub>2</sub>

## 2.3. *In vivo* Versuche

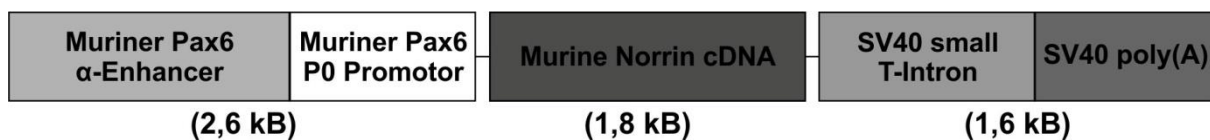
### 2.3.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Tiere zwei verschiedener gentechnisch-veränderter Mauslinien verwendet. Für die Auswirkungen von Norrin im akuten NMDA-Schadensmodell wurden *Lif*<sup>-/-</sup>-Tiere (C57Bl/6) untersucht, die von Prof. Dr. M. Sendtner (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt worden waren. Die Zucht erfolgte durch Verpaarung heterozygoter Mäuse, da homozygote *Lif*<sup>-/-</sup>-Weibchen infertil sind (Escary *et al.*, 1993) und auch homozygote Männchen oft eine geringere Fertilität gegenüber ihren Geschwistertieren aufweisen. Die Analysen im Zusammenhang mit diesem Projekt stellen eine Fortführung der während der Masterarbeit durchgeführten Experimente dar.

Der Einfluss von Norrin im chronischen Schadensmodell erfolgte mithilfe von *Pax6-Norrin*-Mäusen (DBA/2J Hintergrund). Diese wurden innerhalb der Arbeitsgruppe von



PD Dr. Andreas Ohlmann durch Rückkreuzung bereits existierender *Pax6-Norrin*-Tiere (FVB-N Hintergrund) mit DBA/2J-Mäusen generiert. Die Tiere tragen ein Konstrukt, bei dem murine cDNA unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Enhancerelements des murinen *Pax6* Promotors steht. Eine zusätzliche SV40 poly(A) Sequenz, einschließlich des SV40 small T-Intron, liefert das Polyadenylierungssignal (vgl. Abb. 7). Durch das verwendete Promotorkonstrukt kommt es zu einer Überexpression von Norrin in den Neuronen der inneren Retina (Marquardt *et al.*, 2001). Zur Zucht der transgenen Mauslinie wurde jeweils ein transgenes Tier mit einem wildtypischen DBA/2J-Tier verpaart. Erste Arbeiten zu diesem Projekt wurden von Ludwig Zeilbeck während seiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Andreas Ohlmann durchgeführt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des *Pax6-Norrin*-Genkonstrukts**

Die Haltung und Behandlung aller Versuchstiere erfolgte in Übereinstimmung mit dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“. Die Mäuse wurden unter artgerechten Bedingungen (Temperatur  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , relative Luftfeuchtigkeit  $55\text{ } \% \pm 5\text{ } \%$ , Hell-Dunkelintervall 12 Stunden, Futter und Wasser *ad libitum*) in der Tierhaltung der naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg gehalten.

Wildtypische Geschwistertiere fungierten als Kontrolltiere gegenüber den untersuchten gentechnisch-veränderten Mäusen. Zur Unterscheidung der Tiere wurden sie einzeln markiert und Schwanzbiopsien entnommen (s. 2.3.5.1). Die aus den Biopsien gewonnene DNA diente nachfolgend als Matrize für die jeweiligen Genotypisierungs-PCRs (s. 2.4.2).

### 2.3.2. Intraperitoneale und intravitreale Injektionen

Intraperitoneale Injektionen wurden zum Zweck der Anästhesie vor Augeninnendruckmessungen (s. 2.3.4.1) oder Perfusion (s. 2.3.5.2) durchgeführt. Dabei wurde ein Gemisch aus Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) mit Hilfe einer 1 ml Spritze und einer 27 G Kanüle in die Leisten-gegend der Versuchstiere (*Pax6-Norrin* Mäuse) injiziert.

Intravitreale Injektionen hingegen wurden genutzt, um die Auswirkungen von NMDA und rhNorrin auf die Retinae und Sehnerven LIF-defizienter Mäuse untersuchen zu können. Sechs bis acht Wochen alte Tiere wurden durch eine Inhalation mit Isofluran kurzzeitig anästhesiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer 34G-Injektionsnadel (W.P.I., Berlin), welche mit einer 25 µl Hamiltonspritze (Roth, Karlsruhe) verbunden war, die Sklera im Bereich des Augenäquators durchstoßen. Das weitere Einführen der Nadel erfolgte im schrägen Winkel Richtung Augenhintergrund, um eine Verletzung der Linse zu vermeiden und die Lösungen direkt in den *Corpus vitreum* zu applizieren. Pro Auge wurden 3 µl PBS, NMDA oder NMDA/Norrin injiziert. Die Nadel verblieb weitere 20 s im Glaskörper, wodurch eine Anpassung des Auges an das erhöhte Volumen ermöglicht und ein Wiederaustritt der injizierten Lösung vermieden wurde. Anschließend wurde die Nadel vorsichtig aus dem Auge entfernt.

Die Injektion erfolgte stets in beide Augen, wobei das rechte Auge immer als Kontrollauge fungierte:

**Tabelle 10: Schema der intravitrealen Injektionen**

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe2</b>
<b>rechtes Auge</b> (Kontrolle)	PBS	NMDA
<b>linkes Auge</b>	NMDA	NMDA + Norrin

Für die Behandlungen wurden die Reagenzien in folgenden Konzentrationen verwendet:

**Tabelle 11: Konzentrationen der injizierten Reagenzien**

Reagenz	Funktion	Konzentration
NMDA	Glutamatanalogon	10 mM (PBS)
Norrin	Wachstumsfaktor	5 ng/μl (PBS)
PBS	-	-

Die Effekte der Behandlungen wurden durch verschiedene Methoden quantifiziert. Die Expression retinaler Faktoren wurde mithilfe quantitativer RT-PCR bestimmt (s. 2.4.7). Hierfür wurden die Retinae sieben Stunden nach Injektion präpariert. Um die Anzahl apoptotischer Zellen in den Retinae ermitteln zu können, wurden die Augen hingegen 24 Stunden nach der Injektion entnommen und mithilfe eines TUNEL-Assays gefärbt (s. 2.6.4.3).

### 2.3.3. Das NMDA-Schadensmodell

Zur Analyse der Auswirkungen eines *Lif*-Knockouts auf die neuroprotektive Wirkung von Norrin wurde das akut wirksame NMDA-Schadensmodell verwendet. Bei diesem Modell kommt es zu einer exzitatorischen Schädigung retinaler Ganglienzellen und Amakrinzellen, die durch die Bindung des synthetischen Glutamatanalogons N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) an die NMDA-Glutamatrezeptoren initiiert wird. Der darauffolgende irreversible  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt zur Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden und letztendlich zum Absterben der Zellen (Shen *et al.*, 2006). In der Retina finden sich NMDA-Rezeptoren in Ganglien- und Amakrinzellen (Slaughter, 2010), wodurch andere Zelltypen durch die Behandlung unberührt bleiben.

### 2.3.4. Das DBA/2J-Mausmodell

Aufgrund zweier spezieller Mutationen in ihrem Genom entwickeln DBA/2J Mäuse im Laufe ihres Lebens ein Dispersionsglaukom, bei dem es durch das sich zersetzende Iris-Pigmentepithel zu einem Verschluss des Kammerwinkels kommt. Der durch den verhinderten Kammerwasserabfluss ansteigende Augeninnendruck führt daraufhin zu einer progressiven Schädigung retinaler Ganglienzellen (John *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob Norrin auch bei chronischer Degeneration eine neuroprotektive

Wirkung auf retinale Ganglienzellen ausübt, wurde das *Pax6-Norrin*-Konstrukt (vgl. Abb. 7) durch Rückkreuzung in DBA/2J Mäuse (7 Generationen) eingebracht.

#### **2.3.4.1. Messung des intraokulären Drucks**

Der Anstieg des intraokulären Drucks in den *Pax6-Norrin*-Mäusen wurde mithilfe des TonoLab Tonometers (Tioloat Oy, Helsinki, FIN) bestimmt. Bei der von Goldmann entwickelten Methode (Moses, 1958) wird die Kraft gemessen, die die Tonometer-Sonde braucht, um die Cornea im Bereich der Kontaktfläche abzuflachen. Der vom Tonometer ermittelte Druckwert entspricht dabei dem Mittelwert sechs einzelner Messungen. Der intraokuläre Druck der Versuchstiere wurde jeweils im Alter von 2, 5, 8, 9, 10, 11 und 12 Monaten bestimmt. Da der Augeninnendruck im Laufe eines Tages circadianen Schwankungen unterliegt, wurden die Messungen jeweils zur gleichen Tageszeit (14-16 Uhr) durchgeführt. Die Mäuse wurden dabei zunächst mit Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Anschließend wurde von jedem Auge 6x der intraokuläre Druck gemessen und der jeweilige Mittelwert gebildet.

#### **2.3.4.2. Bewertungskriterien für den vorderen Augenabschnitt**

Zur Analyse phänotypischer Veränderungen des vorderen Augenabschnitts wurden sagittale Semidünnschnitte von Augen 12 Monate alter *Pax6-Norrin*-Mäuse angefertigt (s. 2.3.1), nach Richardson gefärbt (s. 2.6.4.2) und lichtmikroskopisch (s. 2.7) aufgenommen. Die Augen wurden bezüglich dreier möglicher Merkmale hin untersucht: das Auftreten einer vorderen Synechie, einer Pigmentepithelatrophie der Iris und einer Atrophie des Ziliarkörpers. Die Ausprägung dieser Veränderungen wurde dabei nach von John *et al.* publizierten Kriterien (John *et al.*, 1998) beurteilt und in die in Tabelle 12 aufgeführten Schweregrade eingeteilt. Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Schweregrade wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests statistisch analysiert.

**Tabelle 12: Bewertungskriterien für Veränderungen der Augenvorderkammer**

Veränderung	Schweregrad	Merkmale
Vordere Synechie	mild	Kammerwinkel ist noch offen
	moderat	Kammerwinkel ist verschlossen, Auftreten pigmentgefüllter Macrophagen
	stark	Kammerwinkel verlegt, Anheftung der Iris an die Cornea, hohe Anzahl von Macrophagen
Pigmentepithel-atrophie der Iris	mild	Irisgefäße vorhanden, posteriores Pigmentepithel ist normal
	moderat	Einzelne Epithelschichten nicht mehr identifizierbar, einige Pigmentzellen noch vorhanden
	stark	Iris auf fadenförmige Struktur ohne erkennbare Pigmentzellen reduziert
Atrophie des Ziliarkörpers	mild	Vier Ziliarfortsätze mit normal aussehendem Epithel und Gefäßen
	moderat	Weniger und kürzere Ziliarfortsätze
	stark	stark atrophisierte Ziliarfortsätze ohne Gefäße

#### 2.3.4.3. Bewertungskriterien der Sehnervenschädigung

Zur Bewertung des Schädigungsgrades der *Nn. optici* von 12 Monate alten *Pax6-Norrin*-Tieren wurden sagittale Semidünnschnitte mit Phenylendiamin gefärbt (s. 2.6.4.1) und mit 100x Vergrößerung lichtmikroskopisch (s. 2.7) aufgenommen. Anhand anerkannter, mehrfach beschriebener Kriterien (Anderson *et al.*, 2005; Libby *et al.*, 2005b) wurde das Ausmaß der Sehnervenschädigung beurteilt und eine Einteilung in einen von drei möglichen Schweregraden vorgenommen (vgl. Tabelle 13). Anschließend wurde die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Schweregrade mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests statistisch analysiert.

**Tabelle 13: Bewertungskriterien für der Sehnervenschädigung**

<b>Schweregrad der Schädigung</b>	<b>Merkmale</b>
mild	keine oder nur wenig geschädigte Axone
moderat	verminderte Axonzahl, höhere Anzahl geschädigter Axone, Auftreten glialer Flächen
stark	stark verminderte Axonzahl, verbliebene Axone oft geschädigt, großflächige gliale Vernarbung

#### 2.3.4.4. Quantifizierung der RGC-Axonzahl

Zusätzlich zur Beurteilung des Schweregrades der *Nn. optici* (s. 2.3.4.3) wurde die Anzahl der Axone retinaler Ganglienzellen (RGC) in den Sehnerven 12 Monate alter *Pax6-Norrin*-Tiere quantifiziert. Hierfür wurden die mit Phenylendiamin kontrastierten Semidünnschnitte der Sehnerven (s. 2.6.4.1) in 100x Vergrößerung am Lichtmikroskop (s. 2.7) aufgenommen und deren Fläche mithilfe der Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) ermittelt. Die anschließend verwendete und modifizierte Quantifizierungsmethode basierte auf einer von Anderson *et al.* entwickelten Technik (Anderson *et al.*, 2005). Ein über das Bild des Sehnerven gelegtes Raster (vgl. Abb. 8) begrenzte dabei fünf Quadrate, die mithilfe des Zählungswerkzeugs der Adobe Photoshop CS3 Extended Software (Adobe, San Jose, USA) ausgezählt wurden. Im Anschluss wurde die ermittelte Axonzahl auf die Gesamtfläche des betreffenden *Nervus opticus* hochgerechnet. Um die evtl. auftretende ungleichmäßige Verteilung der Axone in den geschädigten Sehnerven der DBA/2J Mäuse (Jakobs *et al.*, 2005) zu berücksichtigen, wurde bei der Orientierung des Rasters darauf geachtet, durch die Quadrate eine repräsentative Fläche abzudecken. War der Sehnerv für die Quantifizierung mithilfe dieser Methode zu stark geschädigt, wurde die gesamte Fläche des *Nervus opticus* ausgezählt.

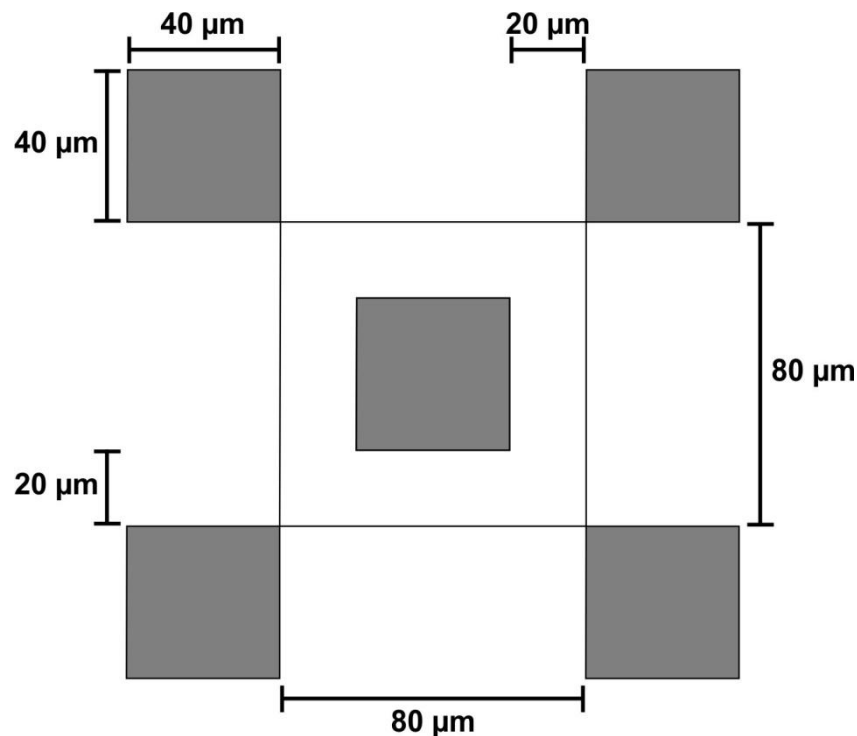


Abbildung 8: Raster zur Quantifizierung der Axonzahl im Nervus opticus

### 2.3.5. Gewebepräparation aus der Maus

#### 2.3.5.1. Ohrmarken und Schwanzbiopsien

Um die verschiedenen Genotypen unterscheiden zu können, wurden die einzelnen Versuchstiere markiert und eine Schwanzbiopsie entnommen. Nach kurzzeitiger Anästhesie durch Isofluran wurde ihnen hierfür mit einer Zange eine mit einer Nummer versehene Ohrmarke in das linke Ohr gesetzt. Mit einer Schere wurde dann die äußerste Spitze (ca. 0,5 cm) ihres Schwanzes abgetrennt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Genotyp mithilfe einer Genotypisierungs-PCR bestimmt (s. 2.4.2).

#### 2.3.5.2. Perfusion

Zur besseren Fixierung der durch die Auswirkungen des Sekundärglaukoms zum Teil stark geschädigten Augen wurden 1 Jahr alte *Pax6-Norrin*-Tiere im Vorfeld der Augenentnahme perfundiert. Die Versuchstiere wurden zunächst mit einem Gemisch aus Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) tief anästhesiert bis sie keinerlei Muskelreflexe mehr zeigten. Daraufhin wurde die

*Cavitas abdominalis* eröffnet, das *Diaphragma* durchtrennt und der *Thorax* lateral auf beiden Seiten aufgeschnitten bis das Herz freigelegt werden konnte. Nach dem Einstich der Ecoflo Kanüle (Dispomed Witt oHG, Geinhausen) in den *Apex cordis* des linken Ventrikels, wurde das rechte Atrium mit einem kleinen Schnitt geöffnet. In einem ersten Schritt wurde über das Perfusionsbesteck mit Heparin versetztes PBS (Heparin 1:1000 in PBS) in das Kreislaufsystems des Tieres eingebracht. Dabei wurde durch das noch schlagende Herz das Blut in den Gefäßen durch die jeweilige Lösung ersetzt. Nachdem eine Entfärbung der Leber aufgrund des Erythrozyten-Mangels sichtbar war, wurde die Heparin-Lösung durch EM-Fixans ersetzt. Sobald die Versteifung des Gewebes eine erfolgreiche Perfusion deutlich machte, wurden die Augen entnommen (s. 2.3.5.3) und zusammen mit den Sehnerven in weiteres EM-Fixans überführt. Im Anschluss daran konnten die Augen und *Nn. optici* in Epon eingebettet und Semidünnschnitte angefertigt werden (s. 2.6.3).

#### **2.3.5.3. Augen- und Sehnervpräparation**

Die Entnahme der Augen mit zugehörigen Sehnerven erfolgte nach Tötung der Versuchstiere durch Perfusion (s. 2.3.5.2) oder zervikaler Dislokation mithilfe einer gebogenen, stumpfen Pinzette (Fine Science Tools, Heidelberg). Die Augen wurden mit gestrecktem Sehnerv in das für die Paraffin-, Kryo- oder Epon-Einbettung (s. 2.6.1, 2.6.2, 2.6.3) benötigte Fixans überführt und nach einer Stunde durch einen Corneaschnitt zur besseren Fixierung der inneren Augenbereiche eröffnet. Waren die Augen für molekularbiologische Analysen bestimmt, wurde direkt nach der Entnahme die Retina präpariert (s. 2.3.5.4).

#### **2.3.5.4. Retinapräparation**

Um die Aufreinigung von retinalem Protein (s. 2.5.2) oder RNA (s. 2.4.4) zu ermöglichen, wurden die Retinae aus den enukleierten Augen (s. 2.3.5.3) präpariert. Dafür wurde zunächst der *Nervus opticus* entfernt, um den Augapfel auf dessen hinterem Bereich stabilisieren zu können. Anschließend erfolgte mithilfe einer Federschere (Fine Science Tools, Heidelberg) eine zirkuläre Inzision unterhalb des Ziliarkörpers, wodurch der vordere Augenabschnitt entfernt und die Linse vorsichtig



aus dem Augenbecher entnommen werden konnte. Der hintere Augenabschnitt wurde radiär eingeschnitten und flach auf dem Untergrund ausgebreitet. Unter Zuhilfenahme einer Feinpinzette (Fine Science Tools, Heidelberg) wurde die Retina vom retinalen Pigmentepithel gelöst und in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl peqGold Trifast™-Reagenz überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die präparierten Retinae bei -20°C gelagert.

## 2.4. Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1. DNA-Extraktion aus der Maus

Um die Genotypisierung der beiden untersuchten gentechnisch-veränderten Mauslinien (s. 2.3.1) zu ermöglichen, wurde DNA aus zuvor entnommenen Schwanzbiopsien (s. 2.3.5.1) extrahiert. Dafür wurden die Gewebestücke mit jeweils 200 µl Proteinase K-Lysepuffer (vgl. Tabelle 8) versetzt und ü.N. bei 55°C und ca. 850 Upm im Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) verdaut. Anschließend wurde die Proteinase für 10 – 15 min bei 95°C inaktiviert. Um die gelöste DNA von den unverdaulichen Resten der Gewebebiopsien zu trennen, wurden die Proben für 5 min bei max. Umdrehung abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA diente dann als Template für die Genotypisierungs-PCR (s. 2.4.2).

### 2.4.2. Polymerase-Kettenreaktion

Während einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wird durch die Auswahl spezifischer Primer ein bestimmtes DNA-Fragment innerhalb einer größeren Sequenz amplifiziert bis es eine Menge erreicht hat, die es ermöglicht, das Fragment durch eine Gelelektrophorese nachzuweisen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit zwei unterschiedlichen Mauslinien gearbeitet. Bei den *Lif*<sup>-/-</sup>-Tieren handelt es sich um eine Knockout-Linie, wodurch der Einsatz zweier unterschiedlicher Primerpaare (vgl. Tabelle 5) für die Genotypisierungs-PCR notwendig war. Ein Paar flankiert einen Bereich innerhalb des *Lif*-Genlocus und amplifiziert eine Wildtyp-Bande, während das zweite Paar an Sequenzanteilen der Neomycin-Kassette bindet, die eingefügt wurde, um das *Lif*-

Gen auszuschalten. Durch einzelnes Auftreten der WT- bzw. KO-Bande oder beider Banden können die drei möglichen Genotypen bestimmt werden.

Die *Pax6-Norrin*-Linie wiederum ist eine transgene Mauslinie. Ein einzelnes Primerpaar reicht aus, um auf die Anwesenheit des Transgens zu testen. Die in diesem Fall verwendeten Primer (vgl. Tabelle 5) amplifizieren einen 300 bp langen DNA-Abschnitt, der vom SV40 Small-T Intron bis zum SV40 poly(A)-Abschnitt reicht (Ohlmann *et al.*, 2010).

Für die Genotypisierungs-PCRs wurden folgende Reaktionsansätze hergestellt:

**Tabelle 14: Reaktionsansätze der Genotypisierungs-PCRs**

	<b>LIF</b>	<b>SV40</b>
10x-Puffer	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,0 µl	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2 µl	0,5 µl
Primer 1 fwd (LIF/SV40, 1:10)	0,5 µl	0,5 µl
Primer 1 rev (LIF/SV40, 1:10)	0,5 µl	0,5 µl
Primer 2 fwd (neo LIF, 1:10)	0,5 µl	--
Primer 2 rev (neo LIF, 1:10)	0,5 µl	--
H <sub>2</sub> O dest.	16,0 µl	19,3 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl	0,2 µl
	23,0 µl	24,0 µl
	+ 2,0 µl Template	+ 1,0 µl Template

Die Reaktionen erfolgten automatisiert in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg).

Es wurden nachfolgende PCR-Programme verwendet:

**Tabelle 15: PCR-Programme für die Genotypisierung-PCRs**

	<b>LIF</b>		<b>SV40</b>	
<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
1 - Initiation	94°C	5 min	96°C	2 min
2 - Denaturierung	94°C	30 sec	94°C	45 sec
3 - Annealing	68°C	45 sec	58°C	1 min
4 - Elongation	72°C	45 sec	72°C	1 min
5 – End-Elongation	72°C	10 min	72°C	5 min
6 - Kühlung	12°C	∞	12°C	∞
	Schritt 2 - 4: 37x (Zyklen)		Schritt 2 - 4: 35x (Zyklen)	

Um sicherzustellen, dass die Untersuchungsergebnisse nicht durch Retina beeinflussende Mutationen in den verwendeten Versuchstieren verfälscht wurden, wurde zusätzlich auf das Auftreten von Rd1 und Rd8 (Crb1) getestet. Dafür wurden folgende Reaktionsansätze und PCR-Programme verwendet:

**Tabelle 16: Reaktionsansätze der Mutations-PCRs**

	<b>Rd1</b>	<b>Rd8</b>
10x-Puffer	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5µl	1,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2 µl	1,5 µl
Primer fwd (fwd1 bzw. 2, 1:10)	0,5 µl	0,5 µl
Primer rev (rev1 bzw. 2, 1:10)	0,5 µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O dest.	17,5 µl	16,8 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl	0,2 µl
	23,0 µl	23,0 µl
	+ 2,0 µl Template	+ 2,0 µl Template

Bei beiden Genotypisierungs-PCRs ist jeweils einer der Primer spezifisch für die WT- bzw. Mutationsvariante des betreffenden Gens, während der dritte für beide Varianten verwendet werden kann. Aufgrund der somit annähernd gleichen

Bandenhöhe, müssen getrennte Reaktionsansätze für beide Varianten hergestellt werden.

**Tabelle 17: PCR-Programme für die Mutations-PCRs**

	<b>Rd1</b>		<b>Rd8</b>	
<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
1 - Initiation	94°C	2 min	94°C	5 min
2 - Denaturierung	94°C	30 sec	94°C	30 sec
3 - Annealing	58°C	40 sec	65°C	30 sec
4 - Elongation	72°C	45 sec	72°C	30 sec
5 - End-Elongation	72°C	5 min	72°C	7 min
6 - Kühlung	12°C	∞	12°C	∞
	Schritt 2 - 4: 36x (Zyklen)		Schritt 2 - 4: 35x (Zyklen)	

#### 2.4.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Darstellung der PCR-Amplifikate wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wird ein elektrisches Feld erzeugt, durch das die PCR-Produkte innerhalb eines Agarosegels nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur Herstellung des Gels wurden die verschiedenen Komponenten (vgl. Tabelle 7) in einer Mikrowelle aufgekocht und unter fließendem Wasser auf ca. 60 °C abgekühlt. Nach anschließendem Hinzufügen der Ethidiumbromid-Lösung (vgl. Tabelle 8) wurde das Gemisch auf einen Kammerschlitten gegossen, evtl. vorhandene Luftblasen entfernt und Plastikkämme eingesetzt. Nach dem Aushärten des Gels wurden die Kämme entfernt, der Schlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und das Agarosegel mit ausreichend 1x TBE-Puffer (vgl. Tabelle 8) bedeckt. Anschließend wurden 8 µl der Proben (PCR-Amplifikate) mit 4x Auftragspuffer (vgl. Tabelle 8) versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Größenidentifizierung wurden zusätzlich 2 µl eines Molekulargewichtsmarkers (GeneRuler® 100bp DNA Ladder, MBI Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 120 V für 45 min. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer entnommen und die PCR-Banden mithilfe von UV-Belichtung im Transilluminator mit Kamerasystem (Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch) dokumentiert.

Die Identifizierung der jeweiligen Genotypen erfolgte durch die Höhe der Banden, die der Länge der einzelnen PCR-Amplifikate entsprach:

**Tabelle 18: Länge der PCR-Produkte**

<b>Genotyp</b>	<b>LIF</b>	<b>SV40</b>	<b>Rd1</b>	<b>Rd8</b>
WT	192 bp	--	400 bp	220 bp
KO bzw. TG	514 bp	300 bp	550 bp	244 bp

#### **2.4.4. RNA-Isolation**

Die für die Expressionsanalysen notwendige RNA wurde mithilfe der peqGOLD TriFast™-Reagenz der Firma peqlab Biotechnology GmbH (Erlangen) aus murinen Retinae isoliert. Durch Kontakt mit der monophasigen Lösung aus Phenol und Guanin-Isothiocyanat kommt es zu einer Denaturierung der Zellkomponenten und zum Abstoppen jeglicher Enzymaktivität, wodurch eine Degradation der vorhandenen RNA verhindert wird. Die Isolation basiert auf der von Chomczynski entwickelten Methode (Chomczynski, 1993) und wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

##### RNA-Isolation mit TriFast™

- 50 -100 mg Gewebe mit 1 ml TriFast™ homogenisieren
- 5 min bei RT inkubieren
- Pro 1 ml TriFast™ 0,2 ml Chloroform zugeben und vortexen
- 3 -10 min bei RT inkubieren
- 5 min bei 12.000 g zentrifugieren
- obere wässrige Phase vorsichtig in neues Reaktionsgefäß überführen (organische Phase und Interphase für Proteinextraktion (s. 2.5.2) bei 4°C lagern)
- pro 1 ml TriFast™ 0,5 ml Isopropanol zusetzen und vortexen
- 5 -15 min auf Eis bzw. bei 4°C inkubieren (Zwischenlagerung der Proben bei -20°C möglich)
- 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen
- Pellet 2x waschen: 1 ml Ethanol 75% zugeben, vortexen und für 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugieren

- Ethanol 75% quantitativ abnehmen und Pellet kurz trocknen lassen
- Pellet in 10 -30 µl RNase-freien H<sub>2</sub>O bei 55 – 60 °C lösen
- Lagerung bei -20°C bzw. -80°C

#### 2.4.5. Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit Hilfe des Spectrophotometers NanoDROP 2000c (peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen), welches die Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) misst. Durch Verwendung der Formel

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

wurde anschließend die Konzentration der RNA bestimmt. Das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm gibt dabei Aufschluss über die Reinheit der untersuchten RNA. Die für die weiteren Analysen verwendeten Proben wiesen einen Quotienten von 1,6 – 2,0 auf.

#### 2.4.6. cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese werden mittels reverser Transkription einzelsträngige DNA-Fragmente synthetisiert, die zur vorliegenden RNA komplementär sind (complementary DNA). Die kodierten Informationen der RNA liegen dadurch in stabilerer Form vor und können zur Analyse durch PCR-Verfahren genutzt werden.

Zur Herstellung der cDNA wurde das qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta, Gaithersburg, USA) verwendet. Es wurde jeweils ein Ansatz mit (+RT) und einer ohne (-RT) reverser Transkriptase mit den in Tabelle 19 aufgeführten Reagenzien hergestellt. Die –RT-Ansätze dienten dabei als Negativkontrolle, um DNA-Verunreinigungen der RNA-Proben ausschließen zu können.

Im Einzelnen wurden folgende Reaktionsansätze pipettiert:

**Tabelle 19: Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese**

	+RT	-RT
0,5 µg RNA	7,5 µl	10µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O		
qScript™ Reaction Mix (5x)	2,0 µl	
qScript™ Reverse Transcriptase	0,5 µl	

Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des Thermocyclers Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Programm:

**Tabelle 20: PCR-Programm für die cDNA-Synthese**

Schritt	Temperatur	Dauer
1	25 °C	5 min
2	42 °C	30 min
3	85 °C	5 min
4	4 °C	∞

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.4.7. Quantitative real-time RT-PCR

Die Expressionsanalyse verschiedener retinaler Faktoren in Norrin-behandelten (*Lif*<sup>-/-</sup>-Mäuse) bzw. Norrin-überexprimierenden (*Pax6-Norrin*-Mäuse) Retinae erfolgte mittels quantitativer real-time RT-PCR. Bei dieser Methode fungiert die aus RNA durch reverse Transkription synthetisierte cDNA als Ausgangsmatrize für die Reaktionsansätze. Durch Zugabe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I, der sich in den Doppelstrang der entstehenden PCR-Produkte einlagert, kann die Zunahme der Amplifikate in Echtzeit (real-time) detektiert werden (Wong & Medrano, 2005). Der Anstieg der auftretenden Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA, wodurch eine Aussage über die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge mRNA getroffen werden kann (Wong &

Medrano, 2005). Der Zyklus in dem die Fluoreszenz zum ersten Mal den Hintergrundwert überschreitet, wird als „cycle threshold“ ( $C_T$ ) oder „crossing point“ ( $C_P$ ) bezeichnet. Je höher die Konzentration der Ausgangs-RNA, desto niedriger ist somit der  $C_T$  –Wert (Wong & Medrano, 2005). Bei der hier angewandten relativen Quantifizierung wurde die Expression der untersuchten Faktoren zur jeweiligen Expression des Referenzgens *Gnb2l1* ins Verhältnis gesetzt.

Für jeden Primer wurden Dreifach-Ansätze der +RT-Proben und Einfach-Ansätze der –RT-Proben in eine 96-Well iCycler IQ PCR Platte (BioRad, München) pipettiert. Die Reaktionsansätze setzten sich dabei aus den in Tabelle 21 aufgeführten Reagenzien zusammen. Anschließend wurden die jeweiligen Primermixe (s. Tabelle 5) zugesetzt und die Platte mit einem Microseal<sup>®</sup> B' Film (BioRad, München) abgedichtet und kurz abzentrifugiert.

**Tabelle 21: Reaktionsansatz für die real-time RT-PCR**

<b>Mastermix (für einen Ansatz)</b>	
cDNA (+RT bzw. -RT)	0,15 µl
10x Puffer	1,50 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,60 µl
dNTPs (25 mM)	0,12 µl
SYBR Green I	0,39 µl
Fluorescein (1:100)	0,015 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,06 µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	7,16 µl
<b>10,00 µl</b>	

**Tabelle 22: Reaktionsansatz (Primer) für die real-time RT-PCR**

<b>Primermix (für einen Ansatz)</b>	
Primer fwd (1µM)	0,08 µl
Primer rev (1µM)	0,08 µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	4,84 µl
<b>5,00 µl</b>	



Die Expressionsanalysen erfolgten im iQ5 Multicolor Realtime PCR Detection System + iCycler (BioRad, München) unter Verwendung des in Tabelle 23 dargestellten PCR-Programms.

**Tabelle 23: PCR-Programm für die real-time RT-PCR**

Schritt	Temperatur	Dauer
1 (1x)	95 °C	15 min
2 (40x)	95 °C	10 s
	60 °C	40 s
3 (1x)	95 °C	1 min
4 (1x)	55 °C	1 min
5 (81x)	55 °C	6 s
6 (1x)	4 °C	∞
Schritt 5: + 0,5 °C je Zyklus (Schmelzkurve)		

Die Daten wurden mit Hilfe der iQ Optical System Software Version 3.0a (Biorad, München) erhoben und die relative Expression der Transkripte nach der  $\Delta\Delta C_T$  - Methode kalkuliert (Livak & Schmittgen, 2001). Hierfür wurden die  $C_T$ -Werte der Zielgene auf die  $C_T$ -Werte des Referenz-Gens (*Gnb2l1*) normalisiert und auf die Menge der Standardbedingungen bezogen.

Die Formeln für die Berechnung lauten:

$$\Delta C_T = C_T ( Gnb2l1 ) - C_T ( Zielgen )$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T ( Standardbedingung ) - \Delta C_T ( Konditionierte Bedingung )$$

$$X = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

## 2.5. Proteinbiochemische Techniken

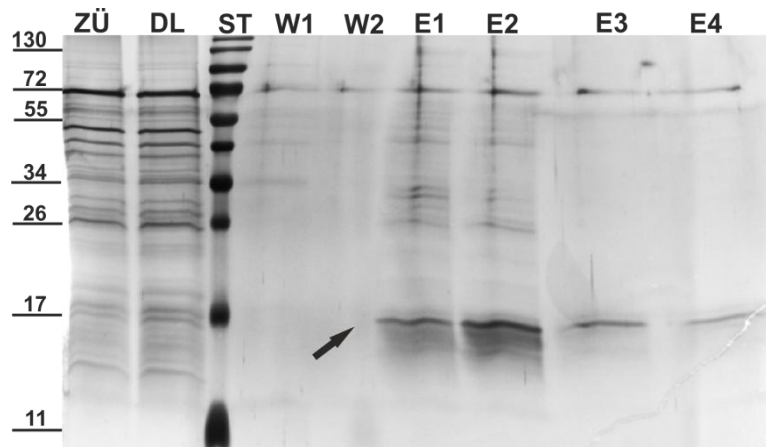
### 2.5.1. Aufreinigung von rhNorrin

#### 2.5.1.1. Affinitätschromatographie

Aufgrund der hohen Affinität zu Heparin (Smallwood *et al.*, 2007) wurde zur Aufreinigung von rekombinantem Norrin aus Zellüberstand von EBNA-pSNOS Zellen (s. 2.2.2) eine Heparin-Agarose Affinitätschromatographie durchgeführt. Wie von Ohlmann *et al.* (Ohlmann *et al.*, 2010) beschrieben, erfolgte die Aufreinigung nach folgenden Schritten:

- 3x waschen der Heparin-Agarose mit 1x PBS durch Zentrifugieren (1000 UpM, 1min)
- Äquilibrierung der Heparin-Agarose mit 1x PBS für 10 min
- Inkubation von 500 ml EBNA-pSNOS Zellüberstand mit 180µl Heparin-Agarose für 30 min bei 4°C
- Zellüberstand mit Heparin-Agarose auf Polypropylen Chromatographiesäule geben
- 500 µl des Zellüberstands und des Durchlaufs als Proben nehmen, restlichen Durchlauf verwerfen
- 2x mit 20 ml 1x PBS waschen, je 500 µl der Waschschritte als Proben auffangen
- Elution des Proteins mit 2x 500 µl 1 M NaCl (in 1x PBS) und 2x 500 µl 2 M NaCl (in 1x PBS), Eluate getrennt und vollständig auffangen

Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der in den Fraktionen enthaltenen Proteine mithilfe von SDS-PAGE (s. 2.5.4). Zur Detektion der Proteinbanden wurde eine Silberfärbung durchgeführt (s. 2.5.6.3). Die für Norrin spezifische Bande liegt bei ca. 17 kDa und wurde durch Roswitha Seitz und Ludwig Zeilbeck während ihrer Doktorarbeiten mittels Norrin- und penta-His-Western Blot Analysen bestätigt. Eluatfraktionen, die ausschließlich eine Norrinbande aufwiesen, wurden im nächsten Schritt dialysiert (s. 2.5.1.2).



**Abbildung 9: Aufreinigung von rhNorrin mittels Affinitätschromatographie**

SDS-PAGE und Silber-färbung der aufgefangenen Fraktionen. ZÜ = Zellüberstand, DL = Durchlauf, ST = Proteinstandard, W1-2 = Waschschrte 1-2, E1-4 = Eluate 1-4. Das Molekulargewicht von Norrin liegt bei ca. 17 kDa (Pfeil). Eluat 3 und 4 wurden aufgrund ausreichender Reinheit für die Dialyse ausgewählt.

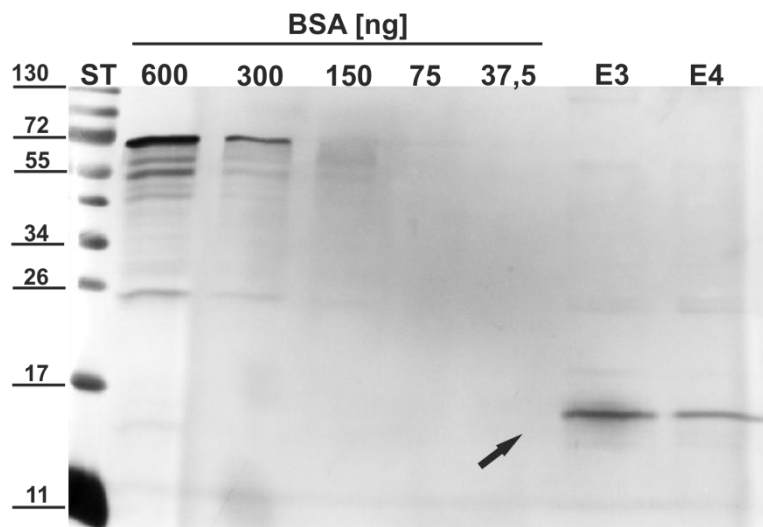
#### 2.5.1.2. Protein-Dialyse

Nicht verunreinigte Norrin-Eluate wurden zur Entfernung der hohen NaCl-Konzentrationen dialysiert. Hierfür wurden ca. 5 cm lange Stücke des Spectra Por7 Dialyseschlauchs (MWCO 3500) für 10 min in H<sub>2</sub>O dest. inkubiert. Anschließend wurden die jeweiligen Fraktionen in den Schlauch überführt, mit einem Schwimmer versehen und auf beiden Seiten mithilfe von Clips verschlossen. Die Dialyse erfolgte unter ständigem Rühren gegen 2,5 l 1x PBS ü.N. bei 4°C. Nach der Überführung in 1,5 ml Reaktionsgefäße wurde die Konzentration des in den Eluaten enthaltenen rhNorrins bestimmt (s. 2.5.1.3).

#### 2.5.1.3. Bestimmung der Norrin-Konzentration

Zur Bestimmung der Norrin-Konzentration in den aufgereinigten Eluaten wurde ein weiteres Silbergel angefertigt. Dafür wurden jeweils 30 µl der einzelnen Norrin-Fraktionen zusammen mit einem BSA-Standard auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.5.4). Die einzelnen BSA-Mengen des Standards betrugen dabei 600 ng, 300 ng, 150 ng, 75 ng und 37,5 ng. Nach Silberfärbung (s. 2.5.6.3) des Gels wurde die Intensität der Norrinbande (17 kDa) mit den verschiedenen BSA-Banden (70 kDa) verglichen und dadurch die Konzentration

des rhNorrins semiquantitativ ermittelt. Anschließend wurden die Lösungen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.



**Abbildung 10: Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten rhNorrins**

SDS-PAGE und Silberfärbung. Die Konzentration der Norrinbande (17 kDa, Pfeil) wurde mithilfe eines BSA-Standards semiquantitativ bestimmt. ST = Proteinstandard, E3-4 = Eluate 3-4.

### 2.5.2. Proteinisolation

Zur Isolierung von Proteinen aus präparierten Retinae von Versuchstieren wurde nach dem von Chomczynski entwickelten Verfahren vorgegangen (Chomczynski, 1993). Hierfür wurde zunächst die RNA aus den zu untersuchenden Gewebeproben nach den Angaben des TriFast™-Protokolls (s. 2.4.4) aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Extraktion der Proteine aus der verbliebenen Interphase und organischen Phase nach den für peqGOLD TriFast™ erstellten Angaben des Herstellers (Pepqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

#### Protokoll der TriFast™-Proteinextraktion

- Zugabe von 0,3 ml 100% Ethanol pro eingesetztem ml TriFast™-Reagenz, Cup 2-3x invertieren
- Inkubation für 3 min bei RT
- 15 min bei 2000 g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen, Pellet verwerfen
- Zugabe von 1,5 ml Isopropanol pro eingesetztem ml TriFast™-Reagenz, vortexen

- Inkubation für 10 min bei RT
- 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet 3x mit 1 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid (in 95% Ethanol) waschen: Inkubation für 20 min bei RT, 5 min bei 7500 g und 4°C zentrifugieren
- Pellet 1x mit 2 ml 100% Ethanol waschen: Inkubation für 20 min, 5 min bei 7500 g und 4°C zentrifugieren
- Überstand quantitativ abnehmen
- Zugabe von 150 µl 1% SDS (in H<sub>2</sub>O dest., versetzt mit jeweils 1:100 Protease- und Phosphatase-Inhibitor)
- Lösen des Pellets ü.N. bei 55°C
- 10 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugieren
- Proteinüberstand in neues Reaktionsgefäß überführen, Pellet verwerfen
- Lagerung bei -20°C bzw. -80°C

### 2.5.3. BCA-Assay

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Mithilfe der von Smith *et al.* publizierte Methode (Smith *et al.*, 1985) kann der Proteingehalt einer Lösung indirekt über einen Farbumschlag sichtbar gemacht werden. In alkalischem Milieu reduzieren Proteine vorhandene Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu Cu<sup>1+</sup>-Ionen, welche dann wiederum mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Intensität der Färbung ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration und kann durch die Messung der optischen Dichte bei 562 nm bestimmt werden (Smith *et al.*, 1985). Für den BCA-Assay wurden jeweils 10 µl der zu untersuchenden Proteinlösungen (unverdünnt, 1:5 und 1:10 verdünnt) in Duplets auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzliche 10 µl einer BSA-Verdünnungsreihe (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1500, 2000 µg/ml in 1% SDS) dienten der Erstellung einer Eichkurve. Im Anschluss daran wurden jedem Well 200 µl einer BCA-Lösung (BCA Reagenz A : Reagenz B = 50:1) hinzugefügt und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Messung der optischen Dichte wurde das Spektralphotometer Sunrise-Basic ELISA-Reader (Tecan Austria GmbH, Grödig,

AUT) verwendet. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mithilfe der Eichkurve und den Mittelwerten der Duplets ermittelt.

#### 2.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der aufgereinigten Proteingemische aus Retinae von LIF-defizienten und *Pax6-Norrin* Mäusen (s. 2.3.1) und aus Zellüberständen von EBNA-pSNOS Zellen (s. 2.2.2) erfolgte mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (Laemmli, 1970). Durch die Bindung des dabei eingesetzten anionischen Detergens SDS (sodium dodecyl sulfate) an die Proteine werden diese entsprechend ihrer Größe negativ geladen und können anschließend in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde eine vertikale Gelelektrophoresekammer nach den Angaben des Herstellers (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen) aufgebaut. Zwischen die beiden Glasplatten der Apparatur wurde die Lösung für das Trenngel (vgl. Tabelle 7) pipettiert und mit Isopropanol überschichtet, um etwaige Luftblasen zu entfernen. Für die Western Blot Analyse von AKT/pAKT in retinalem Gesamtprotein wurde dabei ein 10% Trenngel verwendet, während für die Auftrennung der Norrin-Fraktionen mit anschließender Silberfärbung ein 15% Trenngel zum Einsatz kam. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde der Isopropanol entfernt und die Lösung für das Sammelgel hinzugegeben. Um nach der Polymerisation Taschen für die Proteinlösungen zu erhalten, wurde anschließend ein Plastikkamm zwischen die Glasplatten eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proteinlösungen (20 µg - 40 µg Protein) wurden die Proben mit 4x SDS-Probenpuffer (vgl. Tabelle 8) versetzt, für 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert und kurz abzentrifugiert. Das Aufkochen in Verbindung mit den im Probenpuffer enthaltenen Reagenzien (SDS, β-Mercaptoethanol, DTT) führt zu einer Spaltung der Wasserstoff- und Disulfidbrücken und somit zu einer Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Sobald das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde die Pufferkammer der Elektrophoresekammer mit 1x Elektrodenpuffer (vgl. Tabelle 8) befüllt und die vorbereiteten Proteinproben in die Taschen geladen. Zur Identifizierung des jeweiligen Molekulargewichts der Proteinbanden wurden zusätzlich 5 µl des Molekulargewichtstandards EZ-RUN Pre-Stained Rec Protein Ladder (Fisher Scientific, Schwerte) pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 70 min bei

20 mA (pro Gel) und 300 V. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel für die Western Blot Analyse (s. 2.5.5) oder die Silberfärbung (s. 2.5.6.3) weiter verwendet.

### 2.5.5. Western Blot Transfer

Nach erfolgter Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die für Western Blot Analysen bestimmten Proteinproben elektrophoretisch auf eine PVDF (Polyvinylfluorid)-Membran übertragen. Dafür wurden zunächst die Membran und fünf Whatman-Filterpapiere auf die Größe des Trenngels (7 x 9 cm) zugeschnitten. Zur Aktivierung der Membran wurde diese für wenige Sekunden in Methanol getaucht und anschließend zusammen mit den Whatman-Papieren für 5 min in 1x Transferpuffer (vgl. Tabelle 8) äquilibriert. Für den Transfer kam eine Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) zum Einsatz. Der Semidry Blot wurde nach folgendem Schema aufgebaut:

#### Aufbau Semidry Blot

<b>Kathode (-)</b>
3x Whatman-Papier
SDS-Gel
PVDF-Membran
2x Whatman-Papier
<b>Anode (+)</b>

Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei 25 V. Zur Detektion der gesuchten Proteine wurden diese nachfolgend mithilfe von Antikörpern sichtbar gemacht (s. 2.5.6.1).

### 2.5.6. Nachweis von Proteinen

#### 2.5.6.1. Spezifischer Nachweis mittels Antikörper

Um spezifische Proteine nach dem Western Blot Transfer (s. 2.5.5) auf der PVDF-Membran nachweisen zu können, wurden sie mithilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Der Nachweis erfolgt dabei indirekt über mehrere Stufen nach folgendem Prinzip: spezifische Primärantikörper binden an das gesuchte Antigen, während HRP

(horse radish peroxidase)-konjugierte Sekundärantikörper ein Epitop der Primärantikörper erkennen. Wird anschließend HRP-Substrat zugegeben, kommt es zu einer durch die an die Sekundärantikörper gekoppelten Enzyme katalysierten Reaktion. Die Intensität des dabei entstehenden Chemilumineszenz-Signals entspricht der Menge an vorliegendem Protein. Zur Detektion von AKT/pAKT in den Retinae von *Pax6-Norrin*-Mäusen wurden folgende Schritte durchgeführt:

#### Protokoll der Antikörperdetektion von AKT/pAKT

- Blockierung der Membran mit 5% BSA/TBST für 1h bei RT
- Inkubation mit rabbit- $\alpha$ -AKT bzw. rabbit- $\alpha$ -pAKT (vgl. Tabelle 6) 1:1000 in 5% BSA/TBS-T, ü.N. bei 4°C
- 3x 5 min waschen mit 1x TBST
- Inkubation mit goat- $\alpha$ -rabbit-HRP 1:2000 in 5% BSA/TBST für 1h bei RT
- 3x 5 min waschen mit 1x TBST
- Inkubation mit 800  $\mu$ l Immobilon™Western HRP Substrat für 5 min bei RT im Dunkeln

Die Detektion des Chemilumineszenz-Signals erfolgte mithilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf). Die dabei digital aufgenommenen Banden konnten anschließend mithilfe der Aida Advanced Image Data Analyzer Software (Version 4.06, Raytest, Straubenhardt) densitometrisch ausgewertet werden.

Zur Ladungskontrolle der Proteine auf der PVDF-Membran wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) eingesetzt. Dafür wurde die Membran nach der Detektion des Chemilumineszenz-Signals 2x 5 min mit TBST gewaschen und anschließend für 1h mit rabbit- $\alpha$ -GAPDH-HRP (vgl. Tabelle 6) bei RT inkubiert. Da dieser Antikörper bereits direkt mit HRP gekoppelt war, konnte auf den Einsatz eines Sekundärantikörpers verzichtet werden. Die Detektion und Vermessung des Signals erfolgte wie bereits beschrieben. Als zusätzliche Ladungskontrolle wurden die Proteine anschließend mit Coomassie gefärbt (s. 2.5.6.2).



### 2.5.6.2. Coomassie-Färbung

Die Färbung von PVDF-Membranen mit Coomassie stellt eine weitere Methode da, um Proteine in Western Blot Analysen (s. 2.5.5) nachzuweisen. Der dabei verwendete Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue R 250 bindet an die basischen Seitenketten der Aminosäuren, wodurch es zu einer unspezifischen Färbung aller auf der PVDF-Membran gebundenen Proteine kommt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,1 µg Protein (Berg *et al.*, 2003). Nach der Detektion der Antikörper-Banden wurde die Membran zunächst 2x 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und für 10-20 min mit Coomassie-Färbelösung (vgl. Tabelle 8) bedeckt. Anschließend wurde die PVDF-Membran ü.N. mit Coomassie-Entfärbelösung (vgl. Tabelle 8) inkubiert und am nächsten Tag getrocknet. Die Proteinbanden wurden mithilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) aufgenommen und durch die Aida Advanced Image Data Analyzer Software (Version 4.06, Raytest, Straubenhardt) densitrometrisch ausgewertet. Die Coomassie-Färbung stellt neben dem Nachweis durch spezifische Antikörper (s. 5.5.6.1) eine weitere Möglichkeit der Ladungskontrolle dar. Da der GAPDH-Antikörper nicht in jedem Fall ein auswertbares Signal aufwies, wurde für die AKT/pAKT Analysen Coomassie als Bezugspunkt verwendet.

### 2.5.6.3. Silberfärbung

Die Silberfärbung von SDS-Gelen wurde verwendet, um den Erfolg der Norrin-Aufreinigung (s. 2.5.1.1) zu überprüfen und die Konzentration des rhNorrins anhand eines BSA-Standards semiquantitativ bestimmen zu können (s. 2.5.1.3). Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei dieser sensitiven, von Heukeshoven und Dernick entwickelten Methode bei 0,05 - 0,1 ng (Heukeshoven & Dernick, 1988). Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde das Trenngel mit frisch hergestellten Lösungen (vgl. Tabelle 8) nach folgendem Protokoll gefärbt:

### Protokoll der Silberfärbung

- 30 min Fixierlösung I
- 30 min Fixierlösung II
- 3 x 5 min waschen mit H<sub>2</sub>O dest.
- 20 min Silberlösung
- 2x 1 min waschen mit H<sub>2</sub>O dest.
- 2 – 10 min Entwicklungslösung
- 10 min Stopplösung
- 3x 5 min waschen mit H<sub>2</sub>O dest.
- 30 min (bis zu 6 Monate) Konservierungslösung

Zur Langzeitaufbewahrung wurde das Gel mithilfe zweier Folien auf einen Rahmen gespannt und für mind. zwei Tage getrocknet.

## **2.6. Histologische Arbeitstechniken**

### **2.6.1. Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten**

Zur Detektion apoptotischer Zellen in der Retina mithilfe des TUNEL-Assays (s. 2.6.4.3) und für die immunhistochemischen GFAP-Färbungen (s. 2.6.4.4) der behandelten LIF-defizienten Mäuse wurden Paraffinschnitte hergestellt. Dafür wurden enukleierte Augen (s. 2.3.5.3) zunächst für 4 h mit 4% Paraformaldehyd (PFA) immersionsfixiert und nach 1 h zur besseren Fixierung der Retina durch einen Corneaschnitt eröffnet. Das Fixans wurde durch 3x 20-minütiges Spülen mit 0,1 M Phosphatpuffer (PhP) entfernt. Nachfolgend wurden die Augen für jeweils eine Stunde in Isopropanol 50% und 70% gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung in frischem Isopropanol 70% bei 4°C aufbewahrt.

Die Einbettung erfolgte mithilfe des Einbettautomaten HMP110 (Microm, Waldorf) nach folgendem Schema:

**Tabelle 24: Einbettschema für Paraffinschnitte**

Reagenz	Dauer
Isopropanol 50%	1 h
Isopropanol 70%	1 h ü. N. 1 h
Isopropanol 80%	1 h
Isopropanol 96%	1 h 1 h
Isopropanol 100%	1 h 1 h 2 h
Xylol 100%	1 h 1,5 h
Paraffin 100%	4 h 8 h

Im Anschluss wurden die Augen ausgebettet, indem sie aus den Einbettförmchen in Ausbettrahmen überführt und mit 65°C warmen Paraffin überschichtet wurden. Die sagittale Ausrichtung der Augen wurde durch die Orientierung an Cornea und *Nervus opticus* ermöglicht. Nach Aushärtung des Paraffins auf der Kälteplatte wurden mithilfe des Supercut-Mikrotoms (Reichert-Jung, Kirchseeon) 6 µm dicke Schnitte der Augen angefertigt.

### 2.6.2. Kryoeinbettung und Herstellung von Gefrierschnitten

Für immunhistochemische Untersuchungen (s. 2.6.4.4) an 2 Monate alten *Pax6-Norrin* Mäusen wurden sagittale Kryoschnitte angefertigt. Die präparierten Augen wurden bei RT für 2 h in 4% PFA fixiert. Ein Corneaschnitt ermöglichte das Eindringen der Lösung in das Auge. Nach der Fixierung wurden die Augen 3x für 10 min mit 0,1 M PhP gespült. Um das Gewebe während des Gefriervorgangs zu stabilisieren, wurden die Augen für jeweils mindestens 4 h in Sucrose-Lösungen

aufsteigender Konzentration (10%, 20% und 30% (w/v) Sucrose in 0,1 M PhP) gegeben. Im Anschluss daran erfolgte die Einbettung der Augen in Tissue-Tek® und das Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Unter Verwendung des Microm HM 500 OM Kryostaten (Microm International, Walldorf) wurden dann Gefrierschnitte von ca. 12 µm Dicke hergestellt.

### 2.6.3. Eponeinbettung und Herstellung von Semidünnschnitten

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Genotypen und der Analyse der neuroprotektiven Wirkung von Norrin wurden Semidünnschnitte der Augen und *Nervi optici* von LIF-defizienten Mäusen und *Pax6-Norrin* Tieren angefertigt. Hierfür wurden die enukleierten Augen für mindestens 24 h in EM-Fixans immersionsfixiert und nach einer Stunde durch einen Corneaschnitt eröffnet (s. 2.3.5.3). Im Anschluss wurden die Augen und ihre Sehnerven viermal mit Cacodylat-Puffer (vgl. Tabelle 8) je 30 min gespült und in 1 % Osmiumtetroxid nachfixiert. Die Eponeinbettung erfolgte mithilfe des Einbettautomaten EM TP (Leica, Wetzlar). Dafür wurde zunächst das Osmium durch verschiedene Reagenzien (Cacodylatpuffer, dH<sub>2</sub>O, Ethanol 25, 35, 50, 60, 70%) ausgewaschen und die Augen anschließend in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70, 80, 90, 100%) entwässert. Die Einbettung verlief nach in Tabelle 25 dargestelltem Schema:

**Tabelle 25: Einbettschema für Epon-Semidünnschnitte**

Reagenz	Verhältnis
Propylenoxid	-
Propylenoxid - Epon	2:1
Propylenoxid - Epon	1:1
Propylenoxid - Epon	1:2
Epon	-

Die Eponmischung setzte sich dabei aus den Stammlösungen A und B und einem Zusatz des Beschleunigers DPM-30 zusammen (vgl. Tabelle 8). Die nachfolgende Polymerisation des Epon erfolgte für 48h bei 60°C im Wärmeschrank. Mit Hilfe des Ultracut E-Ultramikrotom (Reichert-Jung, Kirchseeon) wurden im Anschluss Semidünnschnitte von 1 µm Dicke angefertigt. Nach Fixierung auf Objektträgern

erfolgte die Färbung mit Paraphenyldiamin (s. 2.6.4.1) oder nach Richardson (s. 2.6.4.2).

## **2.6.4. Histologische Färbungen**

### **2.6.4.1. Färbung mit Paraphenyldiamin**

Die Kontrastierung der *Nervi optici* erfolgte nach der von Schultze beschriebenen Methode (Schultze, 1972) unter der Verwendung von Paraphenyldiamin. Die Substanz wurde zunächst gelöst (vgl. Tabelle 8) und für drei Tage bei Tageslicht inkubiert bis die Lösung eine dunkle Färbung angenommen hatte. Die angefertigten Semidünnschnitte wurden dann für ca. 3 min mit der vor Gebrauch filtrierten Lösung gefärbt und anschließend mit Ethanol gespült. Nach lichtmikroskopischer Aufnahme der sagittalen Schnitte konnte die Anzahl der Axone in den Sehnerven bestimmt werden (s. 2.3.4.4).

### **2.6.4.2. Färbung nach Richardson**

Die sagittalen Semidünnschnitte der Augen wurden nach dem von Richardson *et al.* etablierten Protokoll gefärbt (Richardson *et al.*, 1960). Dabei wurde die Gebrauchslösung (vgl. Tabelle 8) für 15 – 30 s auf die Dünnschnitte aufgebracht und anschließend gründlich mit H<sub>2</sub>O dest. abgespült. Bis zur mikroskopischen Beurteilung (s. 2.7) verblieben die Schnitte bei RT.

### **2.6.4.3. TUNEL-Färbung**

Um die Anzahl apoptotischer Zellen in den Retinae LIF-defizienter Mäuse quantifizieren zu können, wurden Sagittalschnitte von intravitreal-injizierten Augen mit dem „Dead-End TUNEL-Assay“ (Promega, Mannheim) gefärbt. Die Verwendung des TUNEL-Assays (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) ermöglicht es, in der Apoptose befindliche Zellen sichtbar zu machen, indem die Enden der beim programmierten Zelltod entstehenden DNA-Fragmente fluoreszent markiert werden. Durch die Doppelstrangbrüche weisen die einzelnen DNA-Anteile freiliegende Hydroxylgruppen auf, die mithilfe einer Terminalen

Deoxynukleotidyl-Transferase mit Fluoreszein-12-gekoppelten UTPs versehen werden können (Darzynkiewicz *et al.*, 2008). 24 Stunden nach intravitrealer Injektion (s. 2.3.2) wurden die Augen enukleiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden sagittale Schnitte angefertigt (s. 2.6.1), die zunächst nach folgenden Schema entparaffiniert und rehydriert wurden:

#### Protokoll der Entparaffinierung

- 2x 10 min Xylol
- 2x 10 min Isopropanol 100%
- 2x 5 min Isopropanol 96%
- 2x 5 min Isopropanol 80%
- 1x 5 min Isopropanol 70%
- 1x 5 min Isopropanol 50%
- 1x 5 min H<sub>2</sub>O dest.
- 1x 5 min NaCl-Lösung (0,89%)

Anschließend wurden für die TUNEL-Färbung folgende Schritte durchgeführt:

#### Protokoll TUNEL-Färbung

- 2x 5 min waschen mit 1x PBS
- Fixierung der Schnitte für 15 min mit 4% PFA
- 2x 5 min waschen mit 1x PBS
- Inkubation für 8 min mit Proteinase K (2 µl/ml)
- 2x 5 min waschen mit 1x PBS
- Fixierung für 5 min mit 4% PFA
- 2x 5 min waschen mit 1x PBS
- Inkubation für 10 min mit Equilibration Buffer
- Inkubation bei 37°C für 60 min mit TdT-Reaction Mix (25,5 µl pro Schnitt)
- 15 min waschen mit 2x SSC
- 2x 5 min waschen mit 1x PBS
- Eindecken mit Fluorescent Mounting Medium +DAPI 1:10

Ab der Inkubation mit dem in Tabelle 26 aufgeführten TdT-Reaction Mix wurde im Dunkeln gearbeitet, um ein frühzeitiges Verblässen der Fluochrome zu vermeiden.

**Tabelle 26: Einbettschema für Epon-Semidünnschnitte**

<b>TdT-Reaction Mix</b> (Ansatz für 2 Schnitte)	
Equilibration Buffer	45 µl
Nucleotide Mix	5 µl
rTdT	1 µl
51 µl	

Anschließend wurden die gefärbten Schnitte fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen (s. 2.7) und ausgewertet. Die Zahl der TUNEL-positiven Zellen (grün, GFP-Kanal) wurde mithilfe des Zählungswerkzeugs der Adobe Photoshop CS3 Extended Software (Adobe, San Jose, USA) ermittelt. Da durch NMDA sowohl retinale Ganglienzellen als auch Amakrinzellen geschädigt werden, wurden die Ganglienzellschicht (GCL) und die innere Körnerschicht (INL) ausgezählt und zur jeweiligen Retinalänge ins Verhältnis gesetzt. Diese wurde mithilfe der Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) bestimmt. Der im Mounting Medium gelöste interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau, DAPI-Kanal) färbt die im Gewebe vorhandene genomische DNA und dient der Lokalisation der Zellkerne.

#### **2.6.4.4. Immunhistochemische Färbungen**

Immunhistochemische Färbungen von Paraffin- oder Gefrierschnitten (s. 2.6.1 & 2.6.2) wurden durchgeführt, um spezielle Proteine in Geweben von LIF-defizienten und *Pax6-Norrin* Mäusen nachzuweisen. Die Detektion erfolgt dabei durch die Bildung eines indirekten, mehrstufigen Antigen-Antikörper-Komplexes. Ein spezifischer Primärantikörper bindet an das gesuchte Antigen in der Gewebeprobe, während ein direkt fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper oder eine Kombination aus Sekundärantikörper und Fluochrom-tragendem Tertiärantikörper an den Primärantikörper koppelt. Durch die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs durch Licht einer spezifischen Wellenlänge, kann dann das gesuchte Protein indirekt lokalisiert

werden. Zunächst wurde das jeweilige Einbettmedium von den Schnitten entfernt. Dafür wurden Paraffinschnitte bis zum Schritt des 70% Isopropanols wie bei der TUNEL-Färbung beschrieben (s. 2.6.4.3) entparaffiniert und rehydriert. Gefrierschnitte wurden hingegen kurz mithilfe eines Föns angetaut und für 5 min bei RT mit 0,1 M PhP bzw TBS-T (für pAKT-Färbung) gewaschen.

Für die **GFAP**- und **IBA1**-Färbung wurden die Schnitte zunächst vorbehandelt:

- Inkubation mit 0,05 M Ammoniumchlorid-Lösung für 0,5 – 1 h bei RT
- 3x 5 min waschen mit 0,1 M PhP
- Umranden der Gewebeschnitte mit einem Liquid Blocker PAP-Pen
- Inkubation mit 0,5% Triton-X-100/0,1 M PhP für 5 – 10 min bei RT
- 3x 5 min waschen mit 0,1 M PhP

Die für die **β-Catenin**- und **pAKT**-Färbung bestimmten Schnitte wurden währenddessen nur mit einem Liquid Blocker PAP-Pen umrandet.

Im weiteren Verlauf wurde für jede der Färbungen nach folgendem Protokoll vorgegangen:

#### Protokoll der immunhistochemischen Färbungen

- Blockierung für 1h bei RT
- Inkubation mit Primärantikörpern (in 1:10 verdünnter Blockierungslösung) ü.N. bei 4°C, bei Negativkontrollen stattdessen Inkubation mit 1:10 verdünnter Blockierungslösung
- 3x 5 min waschen mit 0,1 M PhP bzw. 1x TBS-T
- Inkubation mit Sekundärantikörpern (in 1:10 verdünnter Blockierungslösung) für 1h bei RT
- 3x 5 min waschen mit 0,1 M PhP bzw. 1x TBS-T
- gegebenenfalls Inkubation mit Tertiärantikörpern (in 1:10 verdünnter Blockierungslösung) für 1h bei RT
- 3x 5 min waschen mit 0,1 M PhP bzw. 1x TBS-T
- Eindeckeln der Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium + DAPI (1:10)

Ab der Verwendung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers wurde das weitere Protokoll im Dunkeln durchgeführt, um ein frühzeitiges Verblässen der Fluoreszenz



zu vermeiden. Der im Mounting Medium enthaltene Fluoreszenzfarbstoff DAPI dient dabei der Markierung von DNA, wodurch die in der Probe vorhandenen Zellkerne lokalisiert werden können. Tabelle 27 enthält die für die verschiedenen Färbungen verwendeten Blockierungen und Antikörper.

**Tabelle 27: Blockierungen und Antikörper der immunhistochemischen Färbungen**

<b>Protein</b>	<b>Blockierung</b>	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundär- &amp; Tertiärantikörper</b>
<b>GFAP</b> (Paraffin)	2% BSA, 0,1% Triton-X, 0,1 M PhP	rb- $\alpha$ -GFAP, 1:1000 in 1:10 Block-Lsg.	gt- $\alpha$ -rabbit-Cy3, 1:2000 in 1:10 Block-Lsg.
<b><math>\beta</math>-Catenin</b> (Kryo)	3% BSA, 0,1% Triton-X, 0,1 M PhP	rb- $\alpha$ - $\beta$ -Catenin, 1:100 in 1:10 Block-Lsg	gt- $\alpha$ -rabbit-Biotin, 1:500 in 1:10 Block-Lsg.
			Streptavidin-Alexa488, 1:1000 in 1:10 Block-Lsg.
<b>pAKT</b> (Kryo)	3% BSA, 1x TBS-T	rb- $\alpha$ -pAKT, 1:100 in 1:10 Block-Lsg (1x TBS)	gt- $\alpha$ -rabbit-Biotin, 1:500 in 1:10 Block-Lsg.
			Streptavidin-Alexa488, 1:1000 in 1:10 Block-Lsg
<b>IBA1</b> (Kryo)	2% BSA, 0,1% Triton-X, 0,1 M PhP	rb- $\alpha$ -IBA1, 1:500 in 1:10 Block-Lsg.	gt- $\alpha$ -rabbit-Cy3, 1:2000 in 1:10 Block-Lsg.

Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung (s. 2.7) wurden die gefärbten Schnitte bei 4°C im Dunklen gelagert.

## 2.7. Mikroskopie

Zur Durchführung der intravitrealen Injektionen und der Präparation von murinen Retinae wurde das Stereomikroskop Stemi 2000-CS (Carl Zeiss, Göttingen) genutzt. Die Aufnahme von Semidünnschnitten, TUNEL-Färbungen und immunhistochemischen Färbungen erfolgte mithilfe des Licht- und Fluoreszenzmikroskops Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss, Göttingen). Die dabei verwendete Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) kam auch bei der Bearbeitung und Vermessung der Mikroskop-Aufnahmen zum Einsatz.

## 2.8. Datenverarbeitung und Statistik

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel 2007 (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) verwendet. Die statistische Analyse der ermittelten Werte erfolgte mithilfe der SPSS® Software Version 21 (IBM® Corporation, New York, USA). Dabei wurde unter Verwendung eines mehrseitigen ANOVAs und des LSD-Tests das Auftreten signifikanter Unterschiede untersucht. Die Häufigkeitsverteilung der Schweregrade des *Pax6-Norrin* (DBA/2J) – Phänotyps wurde anhand des Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für  $p < 0,05$  (\*), hochsignifikante Unterschiede für  $p < 0,01$  (\*\*) und höchst signifikante Unterschiede für  $p < 0,001$  (\*\*\*) angenommen. Statistische Signifikanz im Bezug zu der Kontrolle wurde in den Abbildungen direkt über dem SEM (Standardfehler)-Balken verzeichnet, weitere Signifikanz über dem Diagramm in Form von horizontalen Strichen angedeutet. Für alle erstellten Abbildungen wurde das Bildbearbeitungsprogramm CorelDRAW® X6 (Corel® Corporation, Ottawa, CAN) verwendet.

### 3. ERGEBNISSE

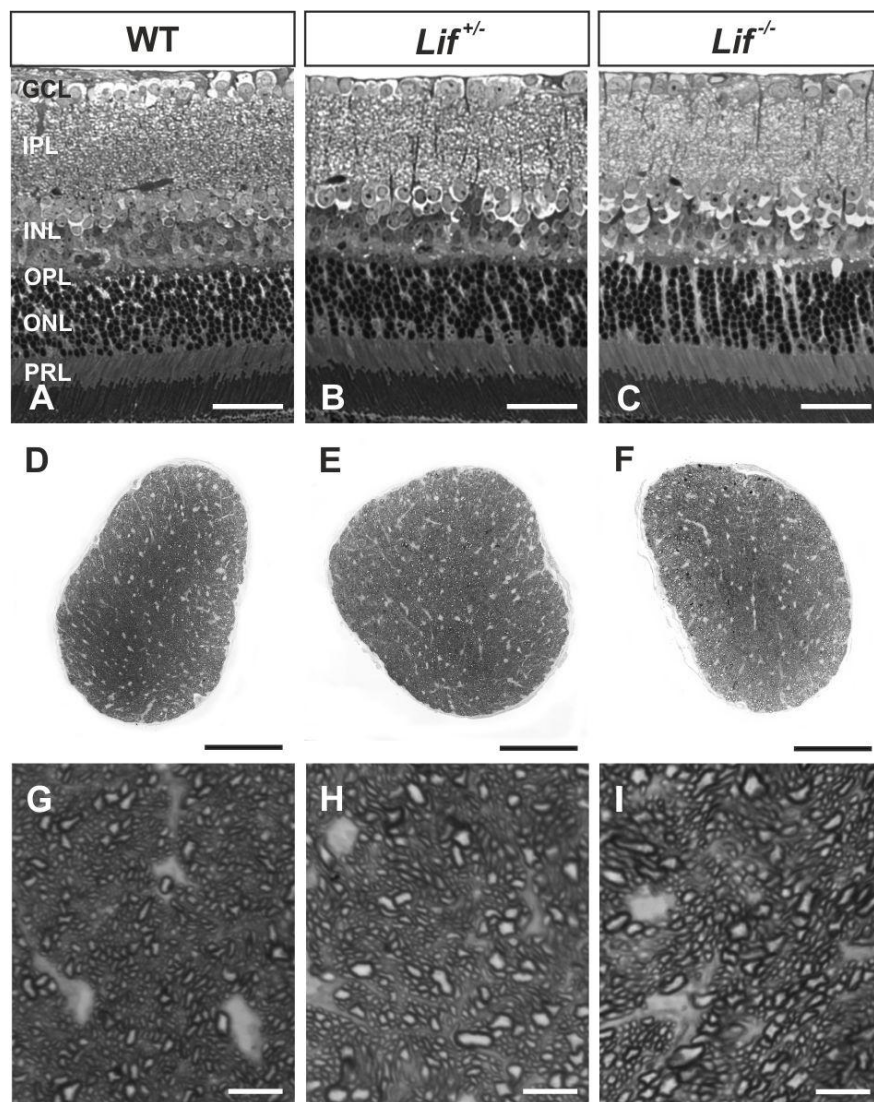
Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Norrin neben angiogenen Funktionen auch eine neuroprotektive Wirkung besitzt (Seitz *et al.*, 2010; Ohlmann & Tamm, 2012; Braunger *et al.*, 2013). Um die Umstände und möglichen Wirkmechanismen dieses Effekts näher zu charakterisieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Mausmodelle untersucht. Zum einen wurde der neuroprotektive Effekt von Norrin in LIF-defizienten Mäusen nach akuter exzitatorischer Schädigung durch NMDA zur weiteren Aufklärung des neuroprotektiven Mechanismus betrachtet. Zum anderen wurde anhand des DBA/2J-Mausmodells die neuroprotektive Funktion von Norrin auf eine chronische Degeneration retinaler Ganglienzellen analysiert.

#### 3.1 Einfluss von LIF auf die neuroprotektive Wirkung von Norrin

Durch NMDA exzitatorisch geschädigte Augen weisen nach zusätzlicher Behandlung mit Norrin eine signifikant höhere Anzahl von Axonen im Sehnerv auf als ausschließlich mit NMDA-injizierte Kontrolltiere (Seitz *et al.*, 2010). Auch konnte in diesem Zusammenhang eine erhöhte Expression von *Lif*, *Edn2* und neurotrophen Faktoren beobachtet werden, woraufhin ein hypothetischer Wirkungsmechanismus basierend auf einem Zusammenspiel dieser Faktoren postuliert wurde (Seitz *et al.*, 2010). Dabei kommt es durch Norrin zu einer vermehrten LIF-Sekretion von Müllerzellen, was einen Anstieg der *Edn2* Expression in retinalen Ganglienzellen oder Photorezeptorzellen zur Folge hat. Dies wiederum induziert eine verstärkte Expression von neurotrophen Faktoren in Müllerzellen und führt dadurch zu einer erhöhten Überlebensrate der geschädigten Nervenzellen (Seitz *et al.*, 2010). Doch auch eine direkte neuroprotektive Wirkung von LIF konnte schon in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Cheema *et al.*, 1994a, 1994b; Patterson, 1994; Metcalf, 2003; Holmberg & Patterson, 2006; Agca & Grimm, 2014). Um den Einfluss von LIF auf die neuroprotektive Wirkung von Norrin analysieren zu können, wurden die Auswirkungen von NMDA und Norrin auf LIF-defiziente Mäuse untersucht. Die hier aufgeführten Daten basieren auf bereits begonnenen Untersuchungen aus der Masterarbeit.

### 3.1.1 Phänotypanalyse der LIF-defizienten Mäuse

Zunächst wurde untersucht, ob eine LIF-Defizienz zu einer offensichtlichen morphologischen Veränderung der Augen, insbesondere der Netzhaut und des *N. opticus* führt. Dafür wurden die Augen entnommen, mit EM-Fixans fixiert und in Epon eingebettet. Anschließend wurden sagittale Semidünnschnitte der Augen und der Sehnerven angefertigt (vgl. Abb. 11).



**Abbildung 11: Lichtmikroskopische Analyse der Retinae und *Nn. optici* LIF-defizienter Mäuse**  
 Repräsentative sagittale Semidünnschnitte der Netzhaut (A-C) und *Nn. optici* (D-I) von *Lif*<sup>-/-</sup> (C, F, I), *Lif*<sup>+/-</sup>-Mäusen (B, E, H) und Wildtypen (A, D, G). Es wurden keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede bezüglich der Schichtdicke oder des retinalen Aufbaus beobachtet. Auch die Gesamt- (D-F) und Detailansichten (G-I) der Sehnerven von LIF-defizienten Tieren zeigten keinen offensichtlichen morphologischen Unterschied zu entsprechenden Wildtypmäusen (WT). GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht, PRL = Photorezeptorschicht. Maßstabsbalken: A-C 50 µm, D-F 100 µm, G-I 10 µm.

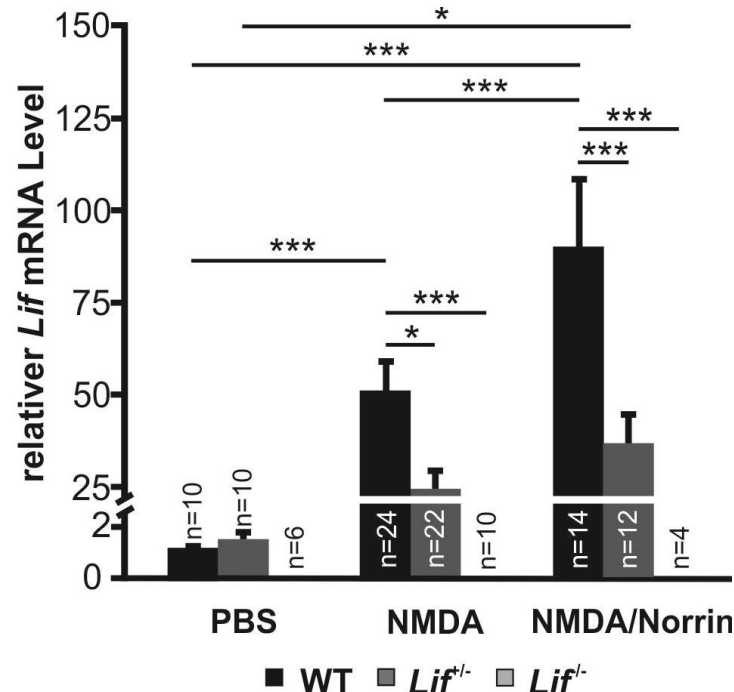
Sowohl *Lif<sup>+/+</sup>*- als auch *Lif<sup>-/-</sup>*- Mäuse zeigen keinen morphologisch offensichtlichen Unterschied im Aufbau oder der Struktur der Retinae im Vergleich zu Retinae von Wildtyptieren desselben Wurfs. Die Dicke der einzelnen Schichten entsprechen denjenigen der anderen Genotypen, auch sind keine Veränderungen der Zellanordnung oder ein atypischer retinaler Aufbau erkennbar (vgl. Abb. 11, A-C). Die *Nervi optici* von *Lif<sup>+/+</sup>*-, *Lif<sup>-/-</sup>*- und Wildtyptieren besitzen einen vergleichbaren Durchmesser (vgl. Abb. 11 D-F) und zeigen ein ähnlichen morphologischen Aufbau in der Detailansicht (vgl. Abb. 11 G-I). Die Dichte der Axone im Sehnerv aller Genotypen ist vergleichbar hoch. Myelinscheiden, die dicker und dunkler gefärbt sind als die übrigen, weisen auf sich degenerierende Axone hin (Seitz *et al.*, 2010). Der Prozentsatz an intensiver gefärbten Myelinscheiden in LIF-defizienten Tieren entspricht ungefähr demjenigen in Wildtyp-Sehnerven, auch wenn die Anzahl in *Lif<sup>-/-</sup>*-Mäusen geringfügig höher erscheint. Auch bezüglich der weißlichen Flächen innerhalb der *Nn. optici*, die Gliazellen und Gefäße enthalten, konnten kein offensichtlicher Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen beobachtet werden.

### 3.1.2 Verifizierung der LIF-Defizienz in der Netzhaut

Da die Abwesenheit von LIF in den verwendeten Mäusen eine essentielle Voraussetzung für die Durchführung der anschließenden Experimente darstellte, wurde der Knockout zunächst durch real-time RT-PCR Analysen der *Lif* mRNA Level verifiziert. Hierfür wurden die Retinae sieben Stunden nach Injektion von PBS, NMDA oder NMDA und Norrin präpariert und real-time RT-PCR Analysen durchgeführt.

Die Expression von *Lif* mRNA in Wildtyp-Kontrolltieren entspricht den Resultaten früherer Untersuchungen bei denen die *Lif* mRNA Level nach Injektion von NMDA deutlich gegenüber PBS-behandelten Retinae erhöht war und nach kombinierter Gabe von NMDA und Norrin noch weiter gesteigert werden konnte (Seitz *et al.*, 2010). So ist die *Lif*-Expression in NMDA-injizierten Retinae hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) um das 49,3-fache gegenüber einer reinen PBS-Behandlung erhöht. Wurden die Augen zusätzlich mit Norrin behandelt, konnte eine weitere hochsignifikante Steigerung ( $p < 0,001$ ) der *Lif* mRNA Spiegel auf das 1,8-fache

verglichen mit reinen NMDA-Gaben beobachtet werden (PBS - NMDA/Norrin 89,6-fache Erhöhung,  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 12: LIF-defiziente Mäuse zeigen verminderte oder fehlende *Lif* mRNA Expression**

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Lif* mRNA Expression in Retinae von hetero- und homozygoten LIF-defizienten und Wildtypmäusen 7h nach intravitrealer Injektion von PBS, NMDA (10mM) oder NMDA (10mM)/Norrin (5ng/μl). Wildtyptiere weisen einen signifikanten Anstieg der *Lif* mRNA Expression nach Injektion von NMDA im Vergleich zu PBS auf, welcher durch eine Injektion von NMDA/Norrin noch weiter gesteigert werden kann. Ein entsprechender Anstieg der Expressionsrate ist auch in *Lif*<sup>+/-</sup>-Mäusen zu sehen, jedoch mit signifikant niedrigeren mRNA Levels als in Wildtypgeschwistertieren. Keinerlei *Lif* mRNA Expression konnte in *Lif*<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden. Mittelwert ± SEM. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Auch heterozygote LIF-defiziente Mäuse zeigten einen Anstieg der *Lif* mRNA Level nach NMDA-Injektion (16,3-fach) und nach kombinierter Gabe von NMDA und Norrin (24,7-fach) im Vergleich zu PBS-behandelten Retinae. Im Vergleich zu Retinae von Wildtypmäusen waren die mRNA Spiegel in den geschädigten *Lif*<sup>+/-</sup>-Augen jedoch deutlich niedriger. So war die *Lif*-Expression in den NMDA-injizierten Retinae der heterozygoten Mäuse signifikant um das 2,0-fache ( $p < 0,05$ ) und in NMDA/Norrin-behandelten Augen um das 2,4-fache ( $p < 0,001$ ) gegenüber den jeweiligen Wildtyp-Augen reduziert (PBS: 1,5-fach höhere *Lif* Level in *Lif*<sup>+/-</sup>-Tieren). In untersuchten Retinae von *Lif*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte hingegen in keiner Behandlungsgruppe *Lif* mRNA

detektiert werden. Diese Daten bestätigten die erfolgreiche retinale Deletion des *Lif*-Gens in den verwendeten LIF-defizienten Tieren.

### **3.1.3 Analyse des Einflusses von LIF an der neuroprotektiven Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen**

Seitz *et al.* konnten zeigen, dass Norrin-behandelte Retinae nach akuter exzitatorischer Schädigung signifikant weniger apoptotische Nervenzellen aufweisen als ausschließlich NMDA-injizierte Kontrolltiere (Seitz *et al.*, 2010). Um zu untersuchen, ob LIF einen Einfluss auf die Vermittlung dieses neuroprotektiven Effekts besitzt, wurden LIF-defiziente Mäuse mit PBS, NMDA oder NMDA/Norrin behandelt. Um die Auswirkungen der jeweiligen Behandlungen beurteilen zu können, wurde in das rechte Auge PBS bzw. NMDA als Kontrolle injiziert, während das linke Auge mit NMDA bzw. NMDA und Norrin behandelt wurde. Als Kontrolltiere wurden wildtypische Geschwistertiere verwendet. 24 Stunden nach intravitrealer Injektion wurden die Augen fixiert und Paraffinschnitte angefertigt. Die Anzahl an apoptotischen Zellen in der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht wurde ausgezählt und zur Länge der Retina ins Verhältnis gesetzt.

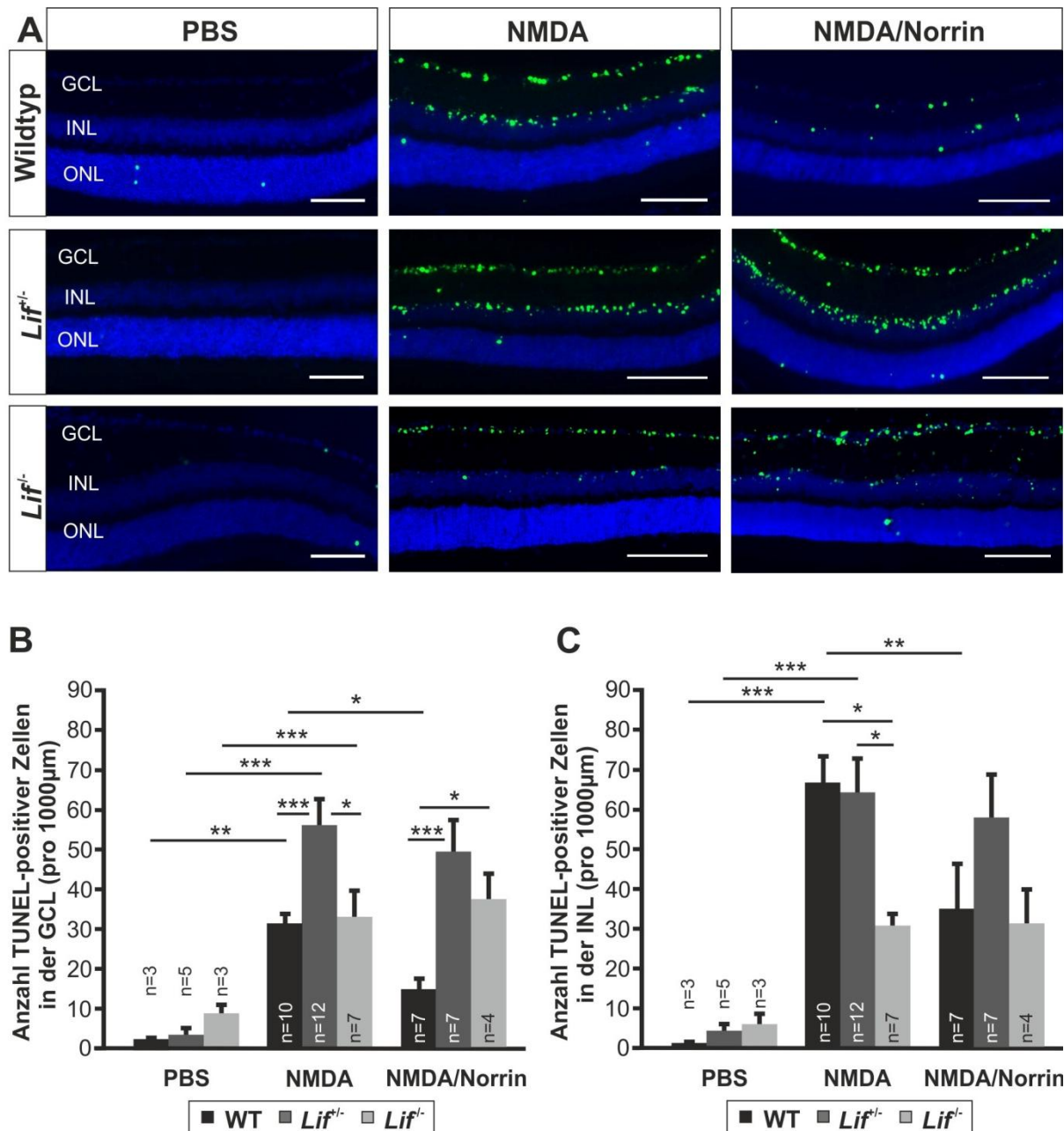
In PBS-behandelten Retinae finden sich keine oder nur wenige TUNEL-positive Zellen. Demgegenüber steigt nach Injektion mit NMDA in allen drei Genotypen die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht deutlich an, da retinale Ganglienzellen und Amakrinzellen exzitatorisch geschädigt wurden. Im Gegensatz zu Wildtyp-Retinae ist nach kombinierter Gabe von NMDA und Norrin die Anzahl an apoptotischen Nervenzellen in LIF-defizienten Mäusen jedoch nicht reduziert (vgl. Abb. 13, A).

Diese morphologische Beobachtung konnte durch die Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen aus vier unabhängigen Experimenten bestätigt werden. In der Ganglienzellschicht weisen LIF-defiziente Mäuse durchgehend mehr apoptotische Zellen auf als ihre wildtypischen Geschwistertiere (vgl. Abb. 13, B). Nach Injektion von PBS liegt die Anzahl an TUNEL-markierten Zellen in Retinae von Wildtyp-Mäusen bei durchschnittlich  $1,80 \pm 0,69$ , in heterozygoten Tieren bei  $3,39 \pm 1,79$  und in homozygoten LIF-defizienten-Mäusen bei  $9,06 \pm 2,19$  pro 1000  $\mu\text{m}$  Retinalänge. Nach Schädigung durch NMDA steigt die Anzahl apoptotischer Nervenzellen hoch

signifikant an. So wurde in Wildtyp-Tieren ein Anstieg auf  $31,82 \pm 3,09$  Zellen ( $p < 0,01$ ) beobachtet, in *Lif<sup>+/+</sup>*-Retinae auf  $58,06 \pm 6,56$  ( $p < 0,001$ ) und in *Lif<sup>-/-</sup>*-Augen auf  $33,87 \pm 7,01$  ( $p < 0,001$ ). Eine Kombination von NMDA und Norrin führt zu einer signifikanten Reduktion ( $p < 0,05$ ) der TUNEL-positiven Zellen in der Ganglienzellschicht von Wildtyp-Retinae auf einen durchschnittlichen Wert von  $14,78 \pm 3,46$  pro 1000  $\mu\text{m}$  Länge. Dies bestätigt den neuroprotektiven Effekt von Norrin auf geschädigte Nervenzellen in der Retina. In LIF-defizienten Tieren ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Sowohl *Lif<sup>+/+</sup>*-Mäuse mit einer Anzahl von  $51,48 \pm 8,00$  als auch *Lif<sup>-/-</sup>*-Tiere mit durchschnittlich  $38,76 \pm 6,63$  markierten Zellen weisen Werte auf, die mit denen einer alleinigen NMDA-Behandlung entsprechen.

Die Auswertung der von Apoptose betroffenen Zellen in der inneren Körnerschicht zeigte ein ähnliches Ergebnis. So ist die Zahl markierter Nervenzellen in PBS-injizierten Retinae durchgehend niedrig. Wildtyp-Tiere weisen einen durchschnittlichen Wert von  $1,25 \pm 0,39$  auf, während die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in LIF-defizienten Versuchstieren bei  $4,52 \pm 1,91$  (*Lif<sup>+/+</sup>*) bzw.  $6,26 \pm 2,70$  (*Lif<sup>-/-</sup>*) pro 1000  $\mu\text{m}$  Retinalänge liegt. Durch exzitatorische Schädigung mit NMDA steigt die Menge an apoptotischen Zellen in Wildtyp-Kontrolltieren auf  $67,70 \pm 6,58$  und in heterozygoten LIF-defizienten Mäusen auf  $64,42 \pm 9,31$  hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) an. Auch Retinae von homozygoten LIF-defizienten Mäusen zeigen mit einem Wert von  $31,04 \pm 3,50$  eine höhere Anzahl von apoptotischen Zellen, jedoch ist der Anstieg weniger hoch im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen. Eine kombinierte Behandlung mit NMDA und Norrin bewirkt in der inneren Körnerschicht von wildtypischen Augen eine signifikante Reduktion ( $p < 0,001$ ) von TUNEL-positiven Zellen auf einen Wert von  $34,52 \pm 12,33$  pro 1000  $\mu\text{m}$ . Die Anzahl apoptotischer Zellen in LIF-defizienten Tieren ist jedoch gegenüber einer alleinigen NMDA-Behandlung nicht reduziert. So weisen *Lif<sup>+/+</sup>*-Mäuse  $58,43 \pm 10,63$  und *Lif<sup>-/-</sup>*-Tiere  $31,51 \pm 9,05$  TUNEL-markierte Nervenzellen in NMDA/Norrin-behandelten Retinae auf. Da in LIF-defizienten Versuchstieren kein neuroprotektiver Effekt von Norrin auf retinale Neurone zu beobachten ist, scheint LIF ein essentieller Bestandteil des Norrin-vermittelten protektiven Wirkmechanismus zu sein.





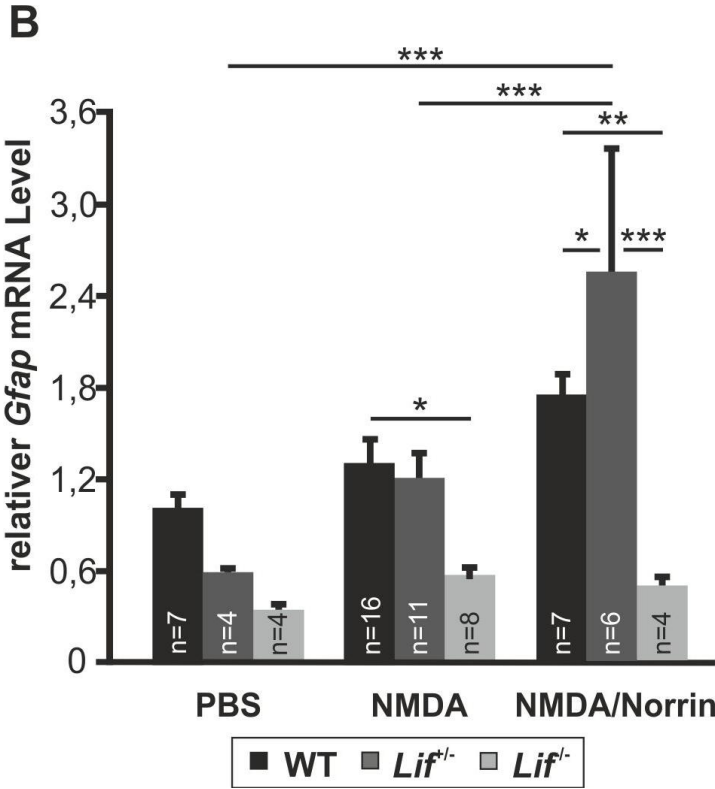
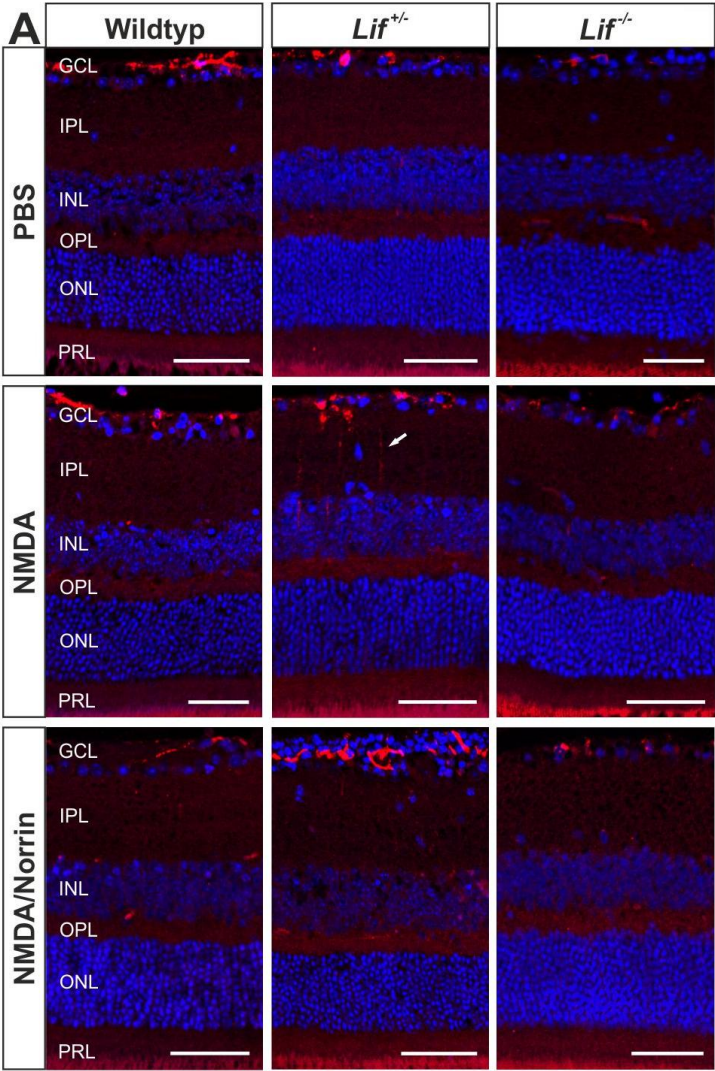
**Abbildung 13: Norrin vermittelt seine neuroprotektive Wirkung über die Induktion von LIF**

**A.** TUNEL-Färbung sagittaler Retinaschnitte von WT, *Lif<sup>+/-</sup>* und *Lif<sup>-/-</sup>* Mäusen zum Nachweis apoptotischer Zellen 24h nach intravitrealer Injektion von PBS, NMDA (10mM) oder NMDA (10mM)/Norrin (5ng/µl). grün: TUNEL-positive Zellen, blau: DAPI-Färbung, GCL = Ganglienzellschicht, INL = innere Körnerschicht, ONL = äußere Körnerschicht, Maßstabsbalken: 50 µm. **B-C.** Quantifizierung der Zellzahl TUNEL-positiver Zellen bezogen auf die Länge der Retina. PBS behandelte Retinae aller drei Genotypen weisen einige wenige TUNEL-markierte Zellen auf, wohingegen Retinae, die durch NMDA geschädigt wurden, einen starken Anstieg an TUNEL-positiven Zellen in der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht zeigen. Nach Injektion von NMDA/Norrin weisen WT-Retinae signifikant weniger apoptotische Zellen verglichen mit NMDA-injizierten Retinae auf. Im Gegensatz dazu bleibt in *Lif*-defizienten Mäusen die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in den Retinae von NMDA/Norrin-behandelten im Vergleich zu NMDA-behandelten Augen unverändert. Mittelwert ± SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.1.4 Norrin vermittelt die gesteigerte Gliosereaktion nach akuter Schädigung in der Netzhaut über die Induktion von LIF

Auf Verletzungen oder andere degenerative Veränderung innerhalb der Retina reagieren Müllerzellen mit einer als Gliosereaktion bezeichneten Umstellung ihres Stoffwechsels (Bringmann & Reichenbach, 2001). Dabei kommt es innerhalb der Zellen zu einer Akkumulation von GFAP (Glial fibrillary acidic protein), welches als Marker für die Aktivierung der Müllerzellen genutzt werden kann (Lewis & Fisher, 2003). Müllerzellen können auf Störungen der Homöostase in unterschiedlicher Weise reagieren. Eine mögliche Reaktion ist die Expression neuroprotektiver Faktoren, durch welche der Untergang der umgebenden Neurone verhindert werden kann (Bringmann *et al.*, 2009). Neben einer direkten Wirkung von Norrin auf degenerierende Nervenzellen, ist auch eine indirekte Wirkung über die Aktivierung von Müllerzellen bei der Vermittlung des neuroprotektiven Effekts von Norrin denkbar. Seitz *et al.* konnten zeigen, dass eine bereits erhöhte Expression von *Gfap* mRNA nach Injektion von NMDA durch eine zusätzliche Applikation von Norrin noch weiter gesteigert wird (Seitz *et al.*, 2010). Untersuchungen von Joly *et al.*, die im Vergleich zu Wildtyptieren und Mäusen mit genetisch bedingter Degeneration der Photorezeptoren (VPP) nur basale *Gfap*-Level in *Lif*<sup>-/-</sup> und *VPP;Lif*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachten konnten, lassen auf eine zentrale Rolle von LIF bei der Verstärkung der Gliosereaktion schließen (Joly *et al.*, 2008). Um den Einfluss von LIF auf eine durch Norrin-induzierte Aktivierung der Müllerzellen zu analysieren, wurden zwei Monate alte LIF-defiziente Mäuse und wildtypische Geschwistertiere mit PBS, NMDA oder NMDA/Norrin intravitreal injiziert und sowohl immunhistologische Färbungen unter Verwendung von anti-GFAP-Antikörpern als auch real-time RT-PCR Analysen der *Gfap* mRNA Level durchgeführt.

Insgesamt fanden sich in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der GFAP-Immunofärbung nur geringe Unterschiede zwischen LIF-defizienten Mäusen und vergleichbaren Kontrolltieren. In der retinalen Ganglienzellschicht aller Genotypen und Behandlungsgruppen fand sich eine intensive Färbung für GFAP, welche mit der *Gfap*-Expression von Astrozyten vereinbar ist. Die Müllerzellen hingegen sind nicht oder nur kaum sichtbar gefärbt (vgl. Abb. 14 A, *Lif*<sup>+/-</sup>-Mäuse nach NMDA-Behandlung), was für niedrige GFAP-Proteinlevel und somit für eine nur schwache Aktivierung der Müllerzellen spricht.



**Abbildung 14: LIF-Defizienz vermindert die Gliosereaktion von Müllerzellen**

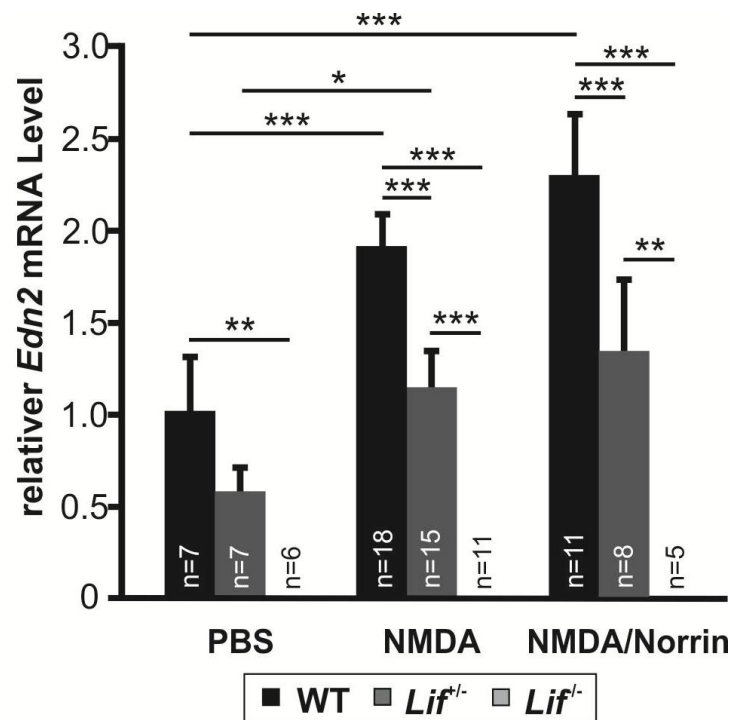
**A.** Immunohistologische Färbung für GFAP von sagittalen Paraffinschnitten der Retinae von WT, *Lif*<sup>+/-</sup>- und *Lif*<sup>-/-</sup>- Mäusen 24 h nach intravitrealer Injektion von PBS, NMDA (10mM) oder NMDA (10mM)/Norrin (5ng/μl). Die Fluoreszenzbilder aller Genotypen und Behandlungsgruppen zeigen eine intensive GFAP-Färbung (rot) der sich innerhalb der Ganglienzellschicht befindlichen Astrozyten, während die Müllerzellen innerhalb der Retina nicht oder nur schwach (Pfeil) gefärbt sind. Ein morphologischer Unterschied zwischen den Genotypen ist nicht erkennbar. Blau: DAPI-Färbung, Maßstabsbalken: 50μm. **B.** Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Gfap* mRNA Expression 7h nach Injektion von PBS, NMDA (10mM) oder NMDA (10mM)/Norrin (5ng/μl). Im Vergleich zu PBS-injizierten Augen kommt es in allen drei Genotypen nach einer Behandlung mit NMDA zu einem tendenziellen Anstieg der *Gfap* mRNA Level. Durch eine zusätzliche Gabe von Norrin steigt die mRNA Expression in *Lif*<sup>+/-</sup>- und WT-Mäusen weiter an, wohingegen sie in *Lif*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf dem gleichen Niveau wie in den PBS- und NMDA-behandelten Gruppen bleibt. Mittelwert ± SEM. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Die Untersuchungen der *Gfap* mRNA Level zeigen ebenfalls eine nur schwache Gliosereaktion der Müllerzellen, jedoch sind Unterschiede zwischen den verwendeten Genotypen und abhängig von der Behandlung erkennbar (vgl. Abb. 14 B). Wildtyp-Kontrolltiere zeigen einen tendenziellen Anstieg der *Gfap*-Expression nach Injektion von NMDA auf das 1,3-fache und nach kombinierter Behandlung mit NMDA und Norrin auf das 1,7-fache im Vergleich zu PBS-behandelten Augen. Auch in heterozygoten LIF-defizienten Mäusen war eine Steigerung der *Gfap*-Level zu beobachten. So zeigen exzitatorisch geschädigte Retinae einen um das 2,1-fache erhöhten Wert, welcher durch eine zusätzliche Norrin-Injektion auf das 4,4-fache gegenüber PBS signifikant ( $p<0,001$ ) gesteigert wurde (NMDA-NMDA/Norrin: 2,1-fach erhöhte Level,  $p<0,001$ ). Mit einer Erhöhung um das 1,7-fache zeigen auch homozygote LIF-defiziente Tiere einen tendenziellen Anstieg der *Gfap*-Expressionlevel nach NMDA-Injektion verglichen mit einer PBS-Behandlung. Im Gegensatz zu den beiden anderen Versuchsgruppen führt eine kombinierte Gabe von NMDA und Norrin jedoch nicht zu einer weiteren Steigerung der *Gfap*-Level im Vergleich zu NMDA-behandelten Retinae. Vergleicht man die Expressionlevel der homozygoten LIF-defizienten Mäuse mit denen der Wildtyp-Vergleichstiere, so liegen sie meist signifikant darunter. Somit ist die Anwesenheit von LIF sowohl für die durch Zellschaden induzierte Aktivierung der Müllerzellen als auch für die weitere Verstärkung der Gliosereaktion durch Norrin essentiell.

### 3.1.5 Expressionsanalyse neuroprotektiver Faktoren in der Retina

Der für Norrin postulierte Signalweg (s. 1.4) basiert auf einer durch LIF induzierten, gesteigerten *Edn2*-Expression, welche schlussendlich zu einer erhöhten Sekretion neurotropher Wachstumsfaktoren führt. Bei einer Abwesenheit von LIF im System sollte dementsprechend eine Induktion dieser Faktoren ausbleiben. Um zu überprüfen, inwiefern die Expression einiger neuroprotektiv wirksamer Faktoren von LIF abhängig ist, wurden PBS-, NMDA- oder NMDA/Norrin-behandelte Retinae sieben Stunden nach Injektion präpariert und die mRNA Level von *Edn2* (Endothelin 2), *Fgf2* (Fibroblast growth factor 2), *Bdnf* (Brain-derived neurotrophic factor) und *Igf1* (Insulin-like growth factor 1) mittels real-time RT-PCR Analyse untersucht.

EDN2 (Endothelin 2) spielt in dem für Norrin angenommenen Signalweg eine zentrale Rolle bei der Vermittlung des neuroprotektiven Effekts. So soll es LIF direkt nachgeschaltet sein, was eine direkte Abhängigkeit von LIF bedingt, und zu einer verstärkten Gliosereaktion beitragen. Wildtyp-Vergleichstiere zeigen eine Steigerung der *Edn2*-Expressionlevel nach den verschiedenen Behandlungen (vgl. Abb. 15 A), jedoch liegen diese unter den für CD-1 Tiere gemessenen Werten (Seitz *et al.*, 2010). Im Vergleich zu reinen PBS-Injektionen kommt es in NMDA-geschädigten Retinae zu einer hochsignifikanten ( $p < 0,001$ ) um das 1,9-fache erhöhten Expression von *Edn2* mRNA, welche nach einer kombinierten Gabe von NMDA und Norrin auf das 2,3-fache des PBS-Wertes ( $p < 0,001$ ) weiter ansteigt (NMDA-NMDA/Norrin: 1,2-facher Anstieg). Die in *Lif*<sup>-/-</sup>-Mäusen gemessenen *Edn2* mRNA Spiegel liegen deutlich, zum Teil hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) unter den für Wildtyp-Kontrolltiere detektierten Werten. Aber auch bei diesen Genotypen ist eine deutliche Steigerung der Expressionsraten zu beobachten. Gegenüber PBS-behandelten Retinae zeigen Augen, die durch NMDA geschädigt wurden, einen signifikant ( $p < 0,05$ ) um das 1,9-fache höheren *Edn2*-Level. Nach einer Behandlung mit NMDA/Norrin konnte auch hier ein 2,3-fach höhere Wert als in PBS-Retinae festgestellt werden (NMDA-NMDA/Norrin: 1,2-facher Anstieg). In *Lif*<sup>-/-</sup>-Mäusen hingegen konnte keine *Edn2* mRNA-Expression detektiert werden, unabhängig von der Behandlung. Insgesamt deuten diese Daten deutlich daraufhin, dass die Norrin-vermittelte Induktion von EDN2 durch LIF vermittelt wird.

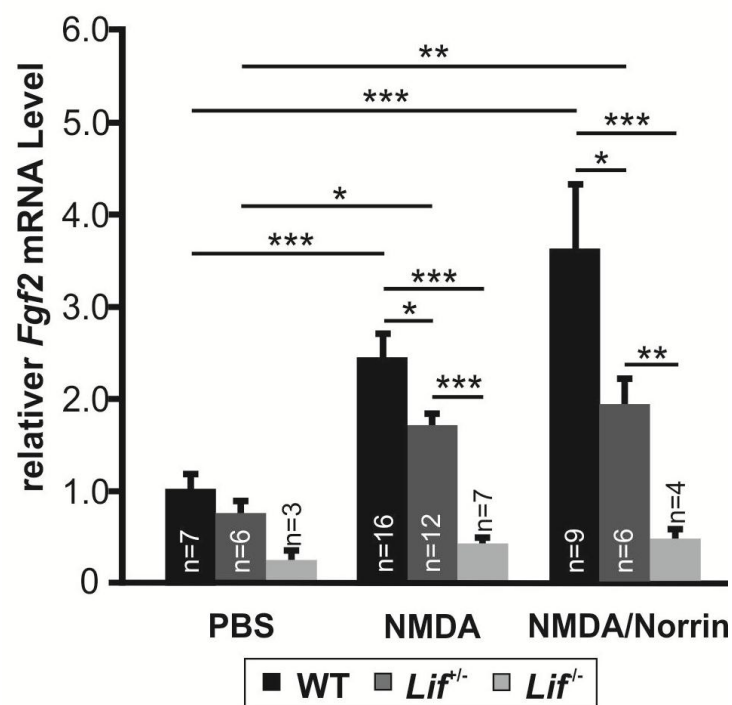


**Abbildung 15: Die Norrin-vermittelte *Edn2*-Expression in der Netzhaut ist abhängig von LIF**

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Edn2* mRNA Level in Retinae von WT, *Lif*<sup>+/-</sup> und *Lif*<sup>-/-</sup> Mäusen 7 h nach intravitrealer Injektion von PBS, NMDA (10mM) oder NMDA (10mM)/Norrin (5ng/μl). Im Vergleich zu PBS-behandelten Augen kommt es in *Lif*<sup>+/-</sup> und WT-Retinae nach Injektion von NMDA zu einem Anstieg der *Edn2*-Expression, die durch Behandlung durch NMDA/Norrin noch weiter gesteigert werden kann. Im Gegensatz dazu konnte in *Lif*<sup>-/-</sup> Mäusen keine *Edn2*-Expression detektiert werden. Mittelwert ± SEM. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

FGF2 (Fibroblast growth factor 2) ist eine neurotropher Wachstumsfaktor, dessen protektive Wirkung auf retinale Neuronen bereits in verschiedenen Schadensmodellen nachgewiesen werden konnte (Unoki & LaVail, 1994; Liu *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2001; O'Driscoll *et al.*, 2007, 2008). Da *Fgf2* in den von Seitz *et al.* durchgeführten Studien die höchsten durch Norrin induzierten mRNA Level aufwies (Seitz *et al.*, 2010), stellt er einen wichtigen potentiellen Signalweg-Mediator dar. Die für *Fgf2* ermittelten Daten zeigen ebenfalls eine Steigerung der mRNA-Expression durch NMDA bzw. NMDA/Norrin (vgl. Abb. 16). In Wildtyptieren steigt der Wert dabei hochsignifikant (p<0,001) um das 2,4-fache in NMDA-behandelten Retinae und um das 3,6-fache in NMDA/Norrin-injizierten Augen im Vergleich zu PBS an (NMDA-NMDA/Norrin: 1,5-fache Erhöhung). Heterozygote LIF-defiziente-Mäuse zeigen wiederum signifikant (p<0,05) niedrigere mRNA-Spiegel als vergleichbare Wildtyp-Geschwistertiere. Dennoch konnte ein Anstieg der *Fgf2* mRNA nach NMDA bzw. NMDA/Norrin-Behandlung beobachtet werden. Retinae mit exzitatorisch geschädigten Ganglienzellen weisen gegenüber PBS-injizierten Augen eine

signifkant ( $p < 0,05$ ) um das 2,3-fache höhere *Fgf2*-Expression auf. Wurden die Augen hingegen mit NMDA und Norrin behandelt, zeigt sich keine weitere Erhöhung der mRNA Level (PBS-NMDA/Norrin: 2,6-facher Anstieg; NMDA-NMDA/Norrin: 1,1-facher Anstieg). Gegenüber den mRNA-Spiegeln von *Edn2*, konnte in homozygoten LIF-defizienten Mäusen *Fgf2* detektiert werden, jedoch sind sie gegenüber Wildtyp- und *Lif<sup>+/-</sup>*-Mäusen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ) reduziert. Nach Injektion von NMDA steigen die *Fgf2*-Spiegel auf den 1,6-fachen Wert der PBS-injizierten Retinae, eine Behandlung mit NMDA kombiniert mit Norrin führt hingegen auch hier nicht zu einer weiteren Steigerung der Expressionslevel (NMDA-NMDA/Norrin: 1,1-fache Erhöhung), was deutlich daraufhin weist, dass auch die Norrin-vermittelte *Fgf2*-Expression durch LIF vermittelt wird.



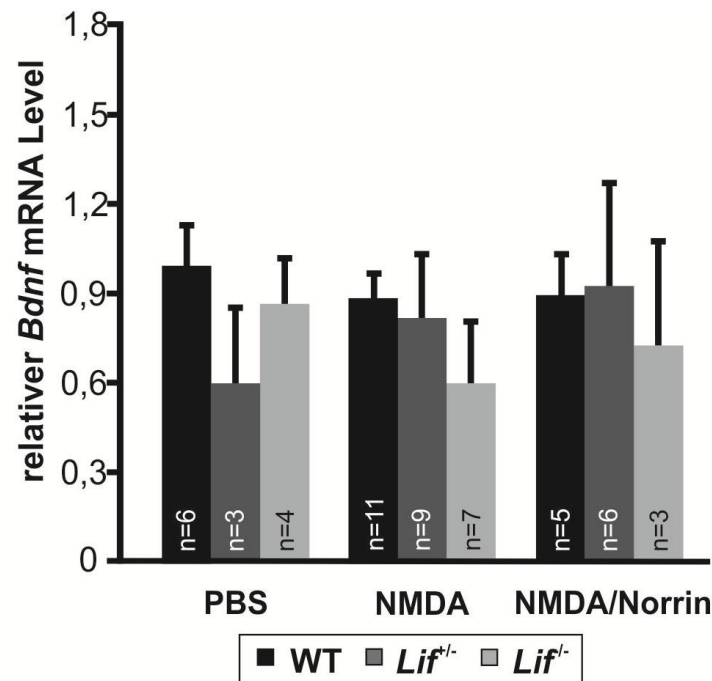
**Abbildung 16: LIF vermittelt die Norrin-induzierte Expression von *Fgf2* in der Retina**

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Fgf2* mRNA Level in Retinae von WT, *Lif<sup>+/-</sup>*- und *Lif<sup>-/-</sup>*-Mäusen 7 h nach intravitrealer Injektion von PBS, NMDA (10mM) oder NMDA (10mM)/Norrin (5ng/μl). Wildtyp-Retinae zeigen gegenüber PBS-injizierten erhöhte *Fgf2*-Expressionslevel nach Behandlung mit NMDA, welche durch eine NMDA/Norrin-Injektion noch weiter angehoben werden. Die detektierten *Fgf2* mRNA Spiegel von *Lif<sup>+/-</sup>*- und *Lif<sup>-/-</sup>*-Mäusen sind im Vergleich zu den untersuchten Wildtyp-Tieren reduziert und weisen nur einen sehr schwachen Expressionsanstieg nach kombinierter Behandlung von NMDA und Norrin auf. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



Ein weiterer Wachstumsfaktor, der durch Norrin und LIF bei der Vermittlung des neuroprotektiven Effekts hochreguliert werden könnte, ist BDNF (Brain-derived neurotrophic factor). In den von Seitz *et al.* durchgeführten Studien wies *Bdnf* den nach *Fgf2* zweithöchsten Expressionsanstieg der mRNA-Level nach einer NMDA/Norrin-Behandlung auf (Seitz *et al.*, 2010). Auch konnten Braunger *et al.* zeigen, dass durch Licht geschädigte Photorezeptoren durch eine transgene Norrin-Überexpression im retinalen Pigmentepithel mittels höhere *Bdnf*-Expression geschützt werden konnten (Braunger *et al.*, 2013). Dem zu Folge sollte der Frage nachgegangen werden, ob Norrin auch nach einer exzitotoxischen Schädigung von RGC *Bdnf* induzieren kann. Die hierfür durchgeführten Analysen zeigen hingegen ein anderes Ergebnis. Die Expressionsraten von *Bdnf* in Wildtyptieren nach kombinierter Injektion von NMDA und Norrin sind mit denen nach PBS- oder NMDA-Behandlung vergleichbar. LIF-defiziente Mäuse weisen *Bdnf* mRNA-Level auf, die tendenziell etwas niedriger sind als die ihrer wildtypischen Geschwistertiere. Im Gegensatz zu Wildtypmäusen und homozygoten LIF-defizienten-Tieren zeigen heterozygote Mäuse einen geringgradigen Anstieg der *Bdnf* mRNA-Spiegel nach NMDA-(1,4-fach) bzw. NMDA/Norrin-Injektion (1,5-fach) gegenüber PBS. Zusammenfassend scheinen weder LIF noch Norrin einen nennenswerten Einfluss auf die Expression von *Bdnf* zu haben.

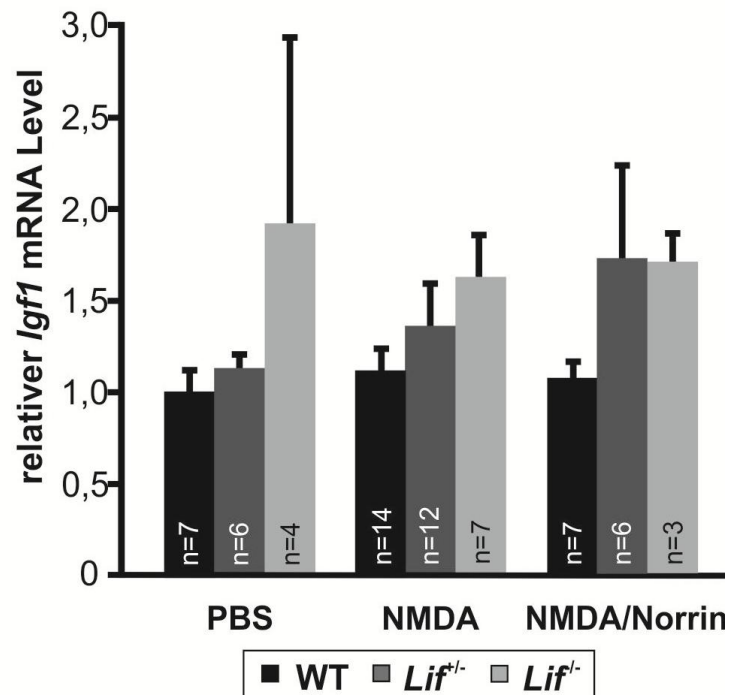




**Abbildung 17: LIF hat keinen Einfluss auf die Expression von *Bdnf* in der Netzhaut**

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Bdnf* mRNA Level in Retinae von WT, *Lif*<sup>+/-</sup> und *Lif*<sup>-/-</sup> Mäusen 7 h nach intravitrealer Injektion von PBS, NMDA (10mM) oder NMDA (10mM)/Norrin (5ng/μl). Weder zwischen den Versuchstiergruppen noch zwischen den jeweiligen Behandlungen konnten nennenswerte Unterschiede in den den *Bdnf*-Expressionsleveln festgestellt werden. Mittelwert ± SEM.

Da transgene Mäuse mit einer Überexpression von Norrin in der RGC-Schicht und einem gleichzeitigen Glaukom (s. 3.2.6) einen erhöhten *Igf1*-Spiegel aufweisen, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die Expressionslevel von *Igf1* getestet (vgl. Abb. 18). Eine Behandlung mit NMDA oder NMDA und Norrin zeigt keinen Einfluss auf die mRNA Expressionslevel von *Igf1* in Wildtyp-Kontrolltieren im Vergleich zu Tieren, die eine alleinige PBS-Injektion erhielten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der bisher getesteten Faktoren, zeigen LIF-defiziente Mäuse eine tendenziell höhere Expression von *Igf1* als vergleichbar behandelte Wildtyptiere, wobei die mRNA Level in homozygoten Knockout-Tieren meist über denen der heterozygoten Mäusen liegen. Auch hier zeigen jedoch nur *Lif*<sup>+/-</sup>-Mäuse einen erwähnenswerten Anstieg (1,6-fach) der mRNA Expression nach kombinierter Gabe von NMDA und Norrin im Vergleich zu PBS-behandelten Retinae (PBS-NMDA: 1,2-fache Erhöhung). Insgesamt deuten die Ergebnisse an, dass eine LIF-Defizienz statt zu einer Verringerung eher zu einer Steigerung der *Igf1*-Expressionsrate führt und somit einen kompensatorischen Mechanismus darstellen könnte.



**Abbildung 18: LIF-Defizienz führt zu tendentiellem Anstieg der *Igf1* Expression in der Retina**

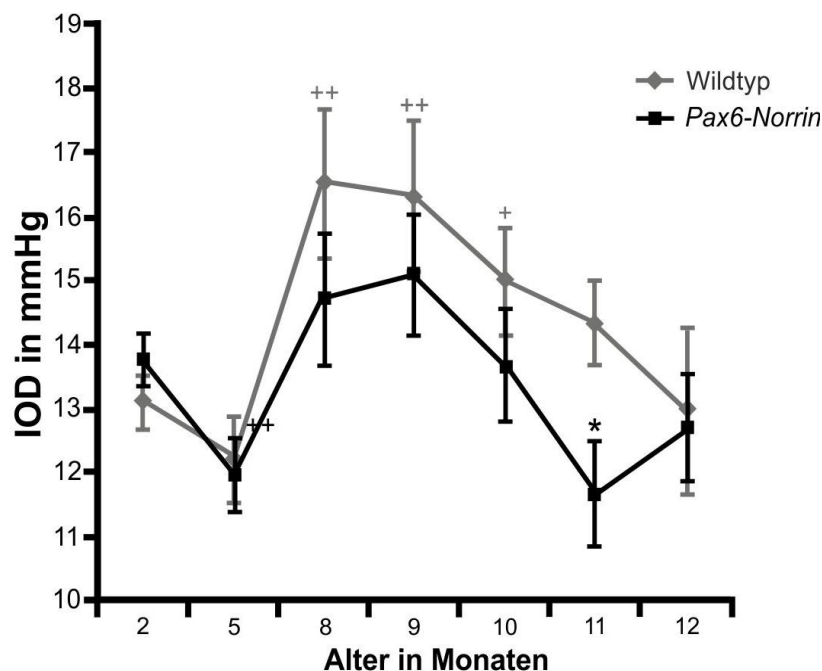
Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Igf1* mRNA Level in Retinae von WT, *Lif*<sup>+/+</sup> und *Lif*<sup>-/-</sup> Mäusen 7 h nach intravitrealer Injektion von PBS, NMDA (10mM) oder NMDA (10mM)/Norrin (5ng/μl). Im Vergleich zu Retinae von Wildtyp-Kontrollmäusen zeigen Augen von LIF-defizienten Versuchstieren tendenziell höhere *Igf1* mRNA Level. Mittelwert ± SEM.

### 3.2 Analyse der neuroprotektiven Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen im DBA/2J-Schadensmodell

DBA/2J-Mäuse entwickeln im Laufe ihres Lebens ein Dispersionsglaukom, wodurch es zu pathologischen Veränderungen des vorderen Augenabschnitts und einer chronischen Degeneration der retinalen Ganglienzellen kommt (John *et al.*, 1998). Erste, von Ludwig Zeilbeck während seiner Doktorarbeit durchgeführte Untersuchungen zeigten Hinweise darauf, dass in DBA/2J-Mäusen, die zusätzlich eine transgene Überexpression von Norrin in den Neuronen der inneren Netzhaut aufweisen, die degenerativen Veränderungen weniger stark ausgeprägt sind als in vergleichbaren Kontrolltieren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten diese Ergebnisse vervollständigt und ein möglicher Signalweg identifiziert werden.

### 3.2.1 Untersuchung des intraokulären Drucks

Die in DBA/2J-Mäusen durch freies Irispigment induzierten Veränderungen im Kammerwinkel, vermindern den Kammerwasserabfluss und haben letztlich einen Anstieg des intraokulären Drucks zur Folge, (John *et al.*, 1998; Libby *et al.*, 2005b). Da ein erhöhter Augeninnendruck beim Menschen als entscheidender Risikofaktor für die glaukomatöse Degeneration retinaler Ganglienzellen gilt, wurden DBA/2J-Mäuse als Glaukommodell verwendet (John *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob auch in den von uns generierten transgenen Mäusen ein erhöhter IOD auftritt und die Überexpression von Norrin den Augeninnendruck von DBA/2J-Mäusen beeinflussen kann, wurde der intraokuläre Druck (IOD) von *Pax6-Norrin*-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren gemessen. Dies geschah mithilfe eines Applanationstonometers im Alter von zwei, fünf, acht, neun, zehn, elf und zwölf Monaten (vgl. Abb. 19).



**Abbildung 19: Norrin vermindert den Anstieg des intraokulären Drucks in *Pax6-Norrin*-Tieren**

Applanationstonometrische Messung des intraokulären Drucks (IOD) von *Pax6-Norrin*-Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren nach 2, 5, 8, 9, 10, 11 und 12 Monaten. *Pax6-Norrin*-Tiere zeigen einen signifikant niedrigeren intraokulären Druck im Vergleich zu Wildtypkontrollmäusen. Mittelwert  $\pm$  SEM. 2 - 8 Monate:  $n \geq 24$ , 9 - 11 Monate:  $n \geq 19$ , 12 Monate:  $n \geq 18$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zu Wildtyp nach 2 Monaten, \* $p < 0,05$  Vergleich Wildtyp und *Pax6-Norrin*.

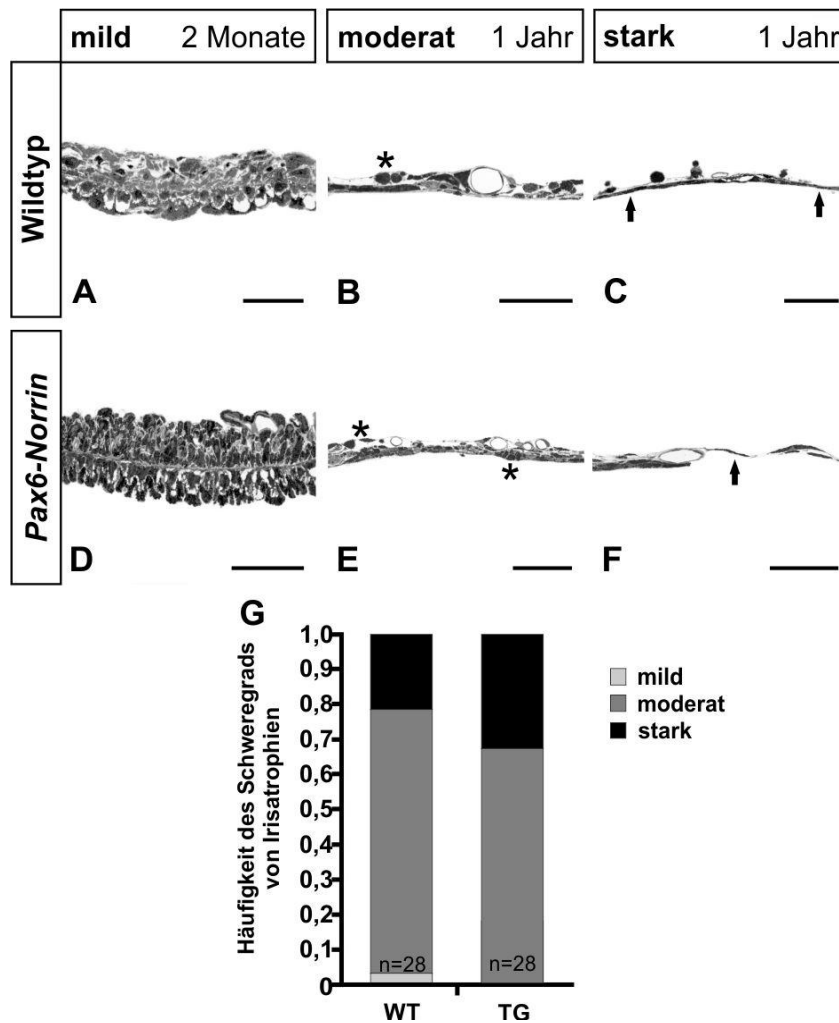
Die applanationstonometrischen Messungen zeigen, dass der intraokuläre Druck in beiden Versuchsgruppen gegenüber dem Ausgangswert nach zwei Monaten (WT (Wildtyp):  $13,09 \pm 0,43$  mmHg; TG (transgen, *Pax6-Norrin*):  $13,78 \pm 0,39$  mmHg) zunächst abfällt, dann deutlich ansteigt, um anschließend wieder zu sinken. Dabei zeigen transgene *Pax6-Norrin*-Tiere jedoch mit Ausnahme des Ausgangswerts durchgehend niedrigere IOD-Level als Wildtyp-Kontrolltiere. So sinkt der intraokuläre Druck in fünf Monate alten *Pax6-Norrin*-Mäusen hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) auf  $11,96 \pm 0,56$  mmHg, während wildtypische Vergleichstiere mit einem Wert von  $12,21 \pm 0,67$  mmHg nur eine geringfügige Absenkung aufweisen. Nach acht und neun Monaten ist der Augeninnendruck in beiden Versuchstiergruppen gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert erhöht. In transgenen Mäusen steigt der Druck auf  $14,71 \pm 1,04$  mmHg bzw.  $15,07 \pm 0,94$  mmHg an. Wildtyptiere zeigen dagegen hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) erhöhte Druckwerte mit  $16,52 \pm 1,17$  mmHg nach acht Monaten und  $16,30 \pm 1,21$  mmHg nach neun Monaten. Im Alter von zehn Monaten beginnt der Augeninnendruck bereits wieder zu sinken. Im Gegensatz zu *Pax6-Norrin*-Mäusen ist der intraokuläre Druck in wildtypischen Versuchstieren mit einem Wert von  $15,02 \pm 0,83$  mmHg jedoch noch immer signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem Ausgangswert erhöht (TG:  $13,68 \pm 0,68$  mmHg). Im Alter von elf Monaten zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen transgenen Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren. Mit einem IOD-Wert von  $11,68 \pm 0,83$  mmHg ist der Augeninnendruck in *Pax6-Norrin*-Tieren sowohl gegenüber dem Ausgangswert nach zwei Monaten als auch gegenüber Wildtypmäusen ( $14,35 \pm 0,64$  mmHg) signifikant ( $p < 0,05$ ) reduziert. Im Alter von zwölf Monaten hat sich der intraokuläre Druck der beiden Versuchsgruppen annähernd angeglichen. So weisen *Pax6-Norrin*-Tiere einen durchschnittlichen Wert von  $12,7 \pm 0,84$  mmHg und Wildtypmäuse einen Wert von  $12,97 \pm 1,32$  mmHg auf. Zusammenfassend zeigen transgene *Pax6-Norrin*-Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen keinen signifikanten Anstieg des IOD bezogen auf den Ausgangsdruck im Alter von zwei Monaten und im Alter von elf Monaten einen signifikant niedrigeren IOD als die Kontrollgeschwistertiere.

### 3.2.2 Morphologische Veränderungen in der vorderen Augenkammer

Mit fortschreitendem Alter kommt es in DBA/2J-Mäusen zu pathologischen Veränderungen in der vorderen Augenkammer (John *et al.*, 1998). Das

Irispigmentepithel atrophiert und die dadurch freigesetzten Pigmentpartikel akkumulieren im Trabekelwerk und induzieren dort die Entwicklung von vorderen Synechien, die letztlich den Kammerwinkel verlegen und den Kammerwasserabflusswiderstand weiter erhöhen. Zusätzlich tritt häufig eine Atrophie des Ziliarkörpers auf, die für das Abfallen des IOD in zwölf Monate alten DBA/2J Mäusen verantwortlich ist (John *et al.*, 1998). Ob das Auftreten niedrigerer IOP-Werte in *Norrin*-überexprimierenden DBA/2J-Mäusen auf weniger starke Veränderungen im vorderen Augenabschnitt gegenüber wildtypischen Tieren zurückgeführt werden kann, wurde anhand von sagittalen Semidünnschnitten von ein Jahr alten *Pax6-Norrin*- und vergleichbaren Wildtypgeschwistertieren untersucht. Die morphologischen Veränderungen wurden dabei jeweils nach John *et al.* in einen von drei möglichen Schweregraden eingeteilt (John *et al.*, 1998). Um einen Vergleich zu einer physiologischen bzw. milden Ausprägung der Vorderkammeranatomie zu ermöglichen, wurden zusätzlich zwei Monate alte Versuchstiere präpariert.

Die Beurteilung des Irisepithels wie auch die der beiden anderen Merkmale erfolgte anhand von 40-fach vergrößerten lichtmikroskopischen Aufnahmen der sagittalen Semidünnschnitte (vgl. Abb. 20 A-F). Gesundes, normal aussehendes Irispigmentepithel ist zweischichtig und weist eine Vielzahl von Pigment-gefüllten Zellen auf. Eine moderat ausgeprägte Irisatrophie liegt vor, wenn einzelne Epithelschichten nicht mehr erkennbar sind und die Zahl der Pigmentzellen stark reduziert ist. Ist das Irisepithel bereits auf eine strangförmige Struktur reduziert und kaum oder gar keine Pigmentzellen mehr vorhanden, wird die Atrophie der Iris als stark ausgeprägt betrachtet. Eine nicht oder nur mild ausgeprägte Schädigung der Iris konnte nur in einem der untersuchten Wildtypiere (3,6%) beobachtet werden (vgl. Abb. 20 G). Eine moderate Irisatrophie lag in 75 % der Wildtypmäuse und in 67,9 % der transgenen *Pax6-Norrin*-Tiere vor und war somit vergleichbar häufig in beiden Versuchsgruppen vertreten. Der Anteil stark geschädigter Iriden war hingegen in transgenen Mäusen höher. So wiesen 32,1% der *Pax6-Norrin*-Mäuse und 21,4 % der wildtypischen Kontrolltiere starke Irisatrophien auf. Insgesamt gesehen konnte jedoch kein statistischer Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden.

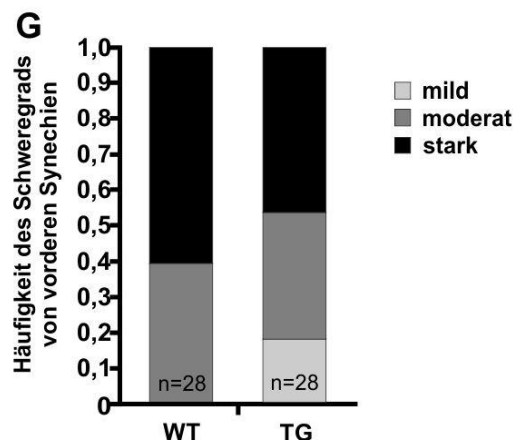
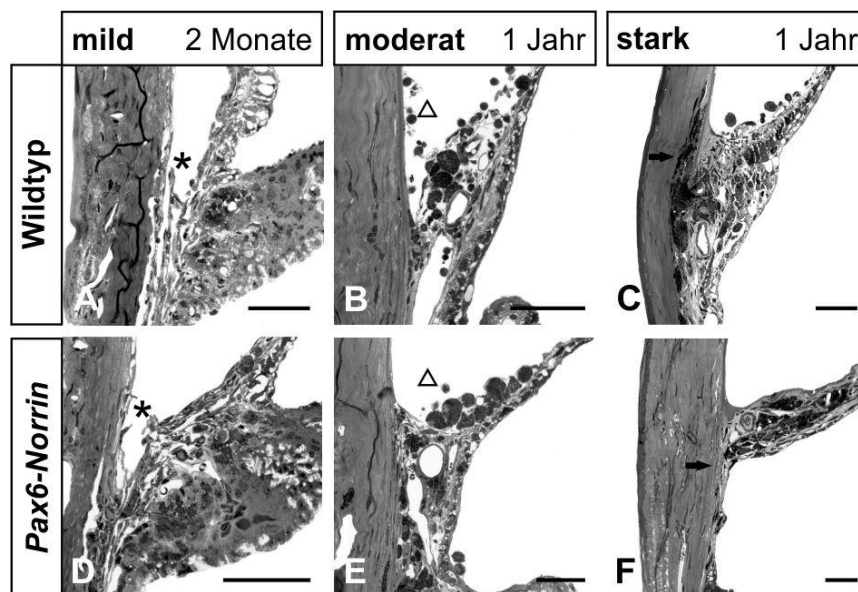


**Abbildung 20: Pax6-Norrin-Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren zeigen eine vergleichbare Verteilung der Irisatrophien**

**A-F.** Lichtmikroskopische Aufnahmen von sagittalen Semidünnschnitten von Iriden von 2 Monate (**A, D**) und 1 Jahr (**B, C, E, F**) alten Pax6-Norrin-Tieren und wildtypischen Geschwistertieren. Die Einteilung der unterschiedlichen Atrophie-Grade erfolgte in Anlehnung an John *et al.* (John *et al.*, 1998): **A, D.** mild: normal entwickeltes zweischichtiges Irisepithel mit geringen Veränderungen; **B, E.** moderat: einzelne Epithelschichten nicht mehr identifizierbar, Pigmentzellen zum Teil noch vorhanden (\*); **C, F.** stark: Die Iris ist auf eine strangförmige Struktur mit wenig oder ohne erkennbare Pigmentzellen reduziert (Pfeil). Maßstabsbalken: 50 µm. **G.** Häufigkeitsverteilung der Schweregrade ein Jahr alter Pax6-Norrin-Mäuse und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere

Zur Analyse der Kammerwinkel wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der verschieden stark ausgeprägten vorderen Synechien in Pax6-Norrin-Mäusen und Wildtyp-Tieren angefertigt und klassifiziert (vgl. Abb. 21 A-F). Als physiologisch normal oder nur mild-beeinträchtigt betrachtete Kammerwinkel sind offen und weisen ein freies Trabekelwerk auf. Ist der Kammerwinkel verschlossen und treten pigmentgefüllten Makrophagen auf, liegt eine moderate Ausprägung vor. Eine starke Schädigung hingegen zeigt sich durch ausgeprägte verlegte Kammerwinkel mit großflächiger Anheftung der Iris an das Cornea-Endothel. Während 17,9 % der

Norrin-überexprimierenden Tiere nach einem Jahr noch immer eine milde Ausprägung der Kammerwinkel zeigten, war dies in Wildtypmäusen nicht der Fall (vgl. Abb. 21 G). In keinem der untersuchten DBA/2J-Augen konnte ein offener Kammerwinkel beobachtet werden. Mit 39,3 % in Wildtyptiere und 35,7 % in transgenen *Pax6-Norrin*-Mäusen wiesen hingegen beide Versuchsgruppen annähernd gleiches Auftreten von moderaten Veränderungen der Kammerwinkel auf. Auch starke Ausprägungen vorderer Synechien waren in beiden Gruppen zu beobachten, jedoch lag der Anteil mit 60,7 % in wildtypischen Kontrolltieren über dem in *Pax6-Norrin*-Mäusen mit 46,4 %. Auch wenn für die beobachtete Verteilung keine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte, scheint eine Überexpression von Norrin die Entwicklung einer stark ausgeprägten Kammerwinkelpathologie von DBA/2J-Mäusen positiv zu beeinflussen.

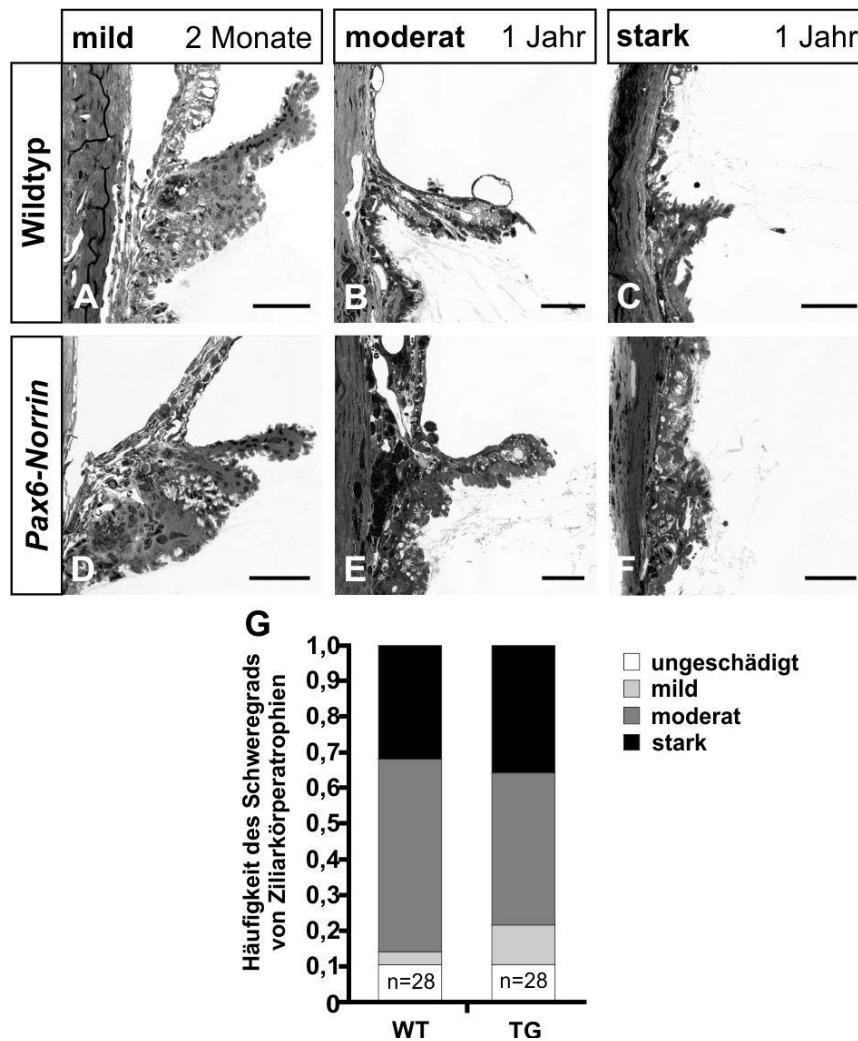


**Abbildung 21: Pax6-Norrin-Mäuse weisen gegenüber Wildtyptieren eine schwächere Kammerwinkelpathologie auf**

**A-F.** Lichtmikroskopische Aufnahmen von sagittalen Semidünnschnitten der Kammerwinkel von 2 Monate (**A, D**) und 1 Jahr (**B, C, E, F**) alten *Pax6-Norrin*-Tieren und wildtypischen Geschwistertieren. Die Einteilung der verschiedenen Synechie-Ausprägungen in drei Schweregrade erfolgte in Anlehnung an John *et al.* (John *et al.*, 1998): **A, D.** mild: Offener Kammerwinkel (\*); **B, E.** moderat: Kammerwinkel ist verschlossen, Auftreten von pigmentgefüllten Makrophagen ( $\Delta$ ); **C, F.** stark: Verlegter Kammerwinkel, zusätzlich Anheftung des Irisepithels an die Cornearückfläche (Pfeil). Maßstabsbalken: 50  $\mu\text{m}$ . **G.** Häufigkeitsverteilung der Schweregrade in *Pax6-Norrin*- und Wildtypmäusen. Während die Ausprägung moderater Synechien in beiden Gruppen gleich häufig auftritt, zeigen *Pax6-Norrin*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyptieren weniger oft starke Ausprägungen der vorderen Synechien. Zusätzlich treten bei den transgenen Tieren auch im Alter von 1 Jahr noch milde Ausprägungen der Synechie auf.

Auch für die Analyse der Ziliarkörperausprägungen wurden die Veränderungen in vier verschiedene Stadien in Anlehnung an John klassifiziert (John *et al.* 1998) (vgl. Abb. 22 A-F). Zusätzlich zu den drei bereits weiter oben beschriebenen Schweregraden, konnte für die Ziliarkörperpathologie noch zwischen nicht geschädigt und nur mild geschädigt unterschieden werden. Im Gegensatz zu völlig normal aussehenden, nicht geschädigten Ziliarkörpern zeigen mild geschädigte leicht verkürzte Ziliarfortsätze. Die Beschaffenheit der einzelnen Fortsätze ist jedoch gleich. Beide Ausprägungen sind durch ein zweischichtiges Epithel und gut erkennbare Gefäße charakterisiert. Moderat geschädigte Ziliarkörper weisen hingegen bereits eine reduzierte Anzahl von Ziliarfortsätzen auf. Morphologische Veränderungen des Ziliarkörpers wurden als stark ausgeprägt betrachtet, wenn die Ziliarfortsätze fast vollständig atrophiert und Epithelstrukturen oder Gefäße kaum mehr erkennbar waren. Sowohl in *Pax6-Norrin*-Mäusen als auch Wildtyp-Vergleichstieren wiesen 10,7% der untersuchten Tiere physiologisch normale, ungeschädigte Ziliarkörper auf (vgl. Abb. 22 G). Auch eine milde Ausprägung der Ziliarkörperveränderungen konnte in 10,7 % der *Pax6-Norrin*-Tiere beobachtet werden. Mit einem Prozentsatz von 3,6 % lag der Anteil mild geschädigter Wildtyp-Augen dagegen unter demjenigen ihrer transgenen Geschwistertiere. Weitaus mehr Ziliarkörper waren dagegen moderat geschädigt. So zeigten 53,6% der Wildtypmäuse und 42,9% der *Norrin*-überexprimierenden Tiere bereits verkürzte Ziliarfortsätze. Stark atrophierte Ziliarkörper, welche kaum noch zu erkennen waren, lagen in 32,1 % der DBA/2J-Wildtypmäuse und in 35,7 % der *Pax6-Norrin*-Tiere vor. So konnte auch in Fall der Ziliarkörperatrophie kein Unterschied zwischen *Pax6-Norrin*-Mäusen und ihren wildtypischen Geschwistertieren beobachtet werden.





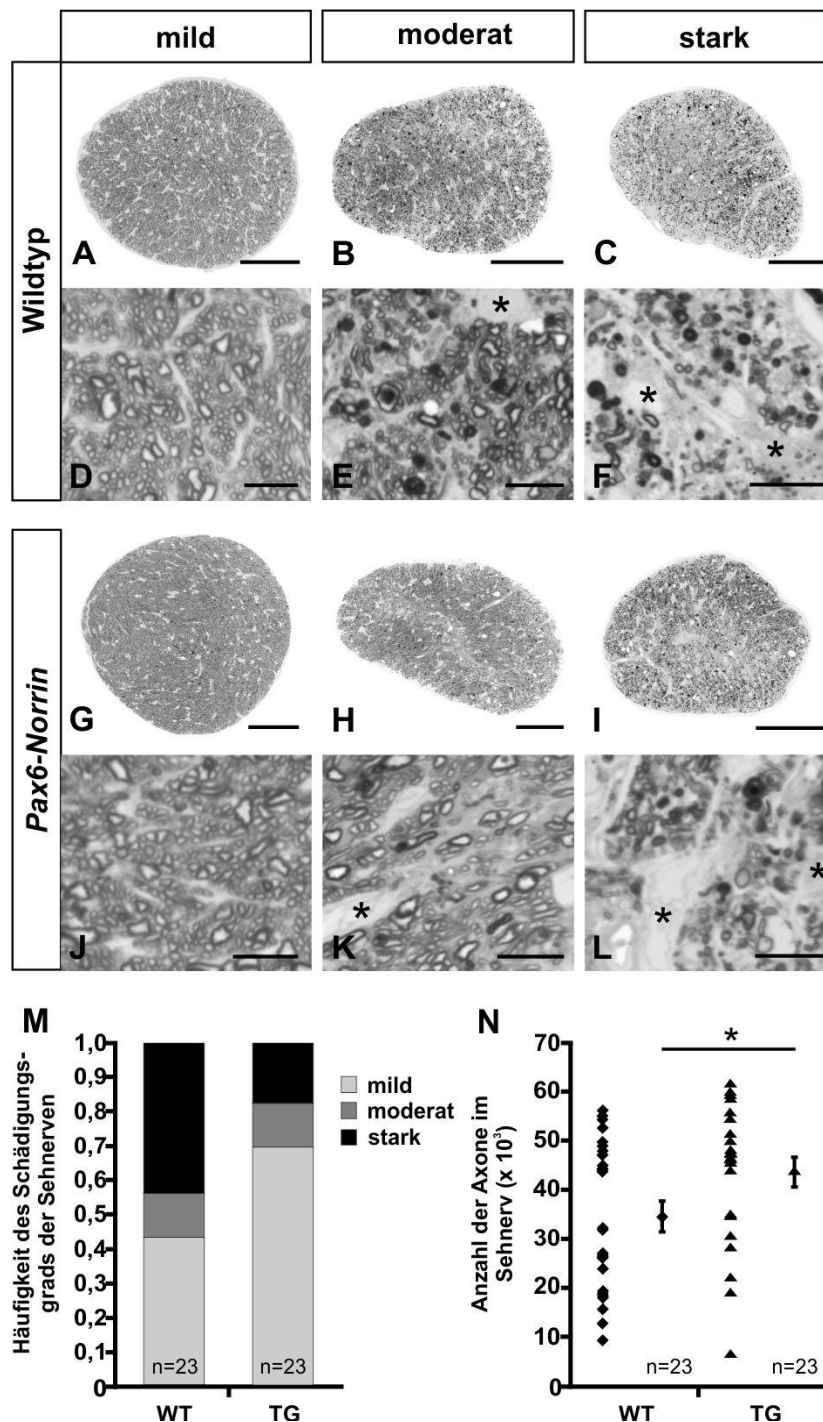
**Abbildung 22: Pax6-Norrin-Mäuse weisen keine Unterschiede in der Verteilung der Ausprägung von Ziliarkörperatrophien gegenüber Wildtyptieren auf**

**A-F.** Lichtmikroskopische Aufnahmen von sagittalen Semidünnschnitten der Kammerwinkel von 2 Monate (**A, D**) und 1 Jahr (**B, C, E, F**) alten Pax6-Norrin-Tieren und wildtypischen Geschwistertieren. Einteilung der verschiedenen Atrophie-Ausprägungen in drei Schweregrade nach John *et al.* (John *et al.*, 1998): **A, D.** mild/ungeschädigt: normal entwickelte Ziliarfortsätze mit zweischichtigem Epithel; **B, E.** moderat: Anzahl der Fortsätze ist reduziert, Ziliarfortsätze sind verkürzt; **C, F.** stark: stark atrophisierte Ziliarfortsätze. Maßstabsbalken: 50 µm. **G.** Häufigkeitsverteilung der Schweregrade von Pax6-Norrin- und Wildtypmäusen. Die Ausprägungshäufigkeiten von Pax6-Norrin-Mäusen weisen kaum Unterschiede zu denen ihrer wildtypischen Geschwistertiere auf. Milde und starke Schweregrade der Ziliarkörperatrophie zeigen sich in Pax6-Norrin-Tieren geringfügig häufiger als in vergleichbaren Wildtyptieren, wohingegen moderate Ausprägungen häufiger in Wildtyp-Kontrolltieren zu finden sind.

### 3.2.3 Analyse der Sehnervenschädigung

Der erhöhte Augeninnendruck in DBA/2J-Mäuse hat eine Degeneration der retinalen Ganglienzellen zur Folge (John *et al.*, 1998). DBA/2J-Mäuse, welche eine Norrin-Überexpression in den Neuronen der inneren Retina aufweisen, zeigen niedrigere

IOD-Werte als vergleichbare wildtypische Geschwistertiere (s. 3.2.1). Inwiefern sich die Überexpression von Norrin auf das Überleben der retinalen Ganglienzellen im chronischen Glaukommodell auswirkt, wurde anhand von ein Jahr alten *Pax6-Norrin*-Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren analysiert. Hierfür wurden sagittale Semidünnschnitte der *Nervi optici* optisch beurteilt und nach allgemein anerkannten Kriterien von Anderson *et al.* und Libby *et al.* (Anderson *et al.*, 2005; Libby *et al.*, 2005b) in drei Schweregrade eingeteilt. Zusätzlich wurde die Anzahl der Axone in den jeweiligen Sehnerven bestimmt.



**Abbildung 23: Norrin vermindert die Degeneration von RGC in *Pax6-Norrin*-Mäuse**

**A-K.** Lichtmikroskopische Übersichts- (**A - C, G - I**) und Detailaufnahmen (**D - F, J - L**) von sagittalen Semidünnschnitten der *Nn. optici* ein Jahr alter *Pax6-Norrin*-Mäuse und Wildtyp-Kontrolltiere. Einteilung der Sehnerven nach Ausprägung der Schädigung in drei Schweregrade in Anlehnung an Anderson und Libby (Anderson *et al.*, 2005; Libby *et al.*, 2005b): **A, D, G, J.** mild: keine oder nur wenig geschädigte Axone, **B, E, H, K.** moderat: verminderte Axonzahl, höhere Anzahl von geschädigten Axonen, Auftreten von glialen Narbenarealen (\*), **C, F, I, L.** stark: stark verminderte Axonzahl, verbliebene Axone sind oft geschädigt, großflächige gliale Vernarbung (\*). Maßstabsbalken: A – C, G-I: 50 µm, D-F, J-L; 10 µm. **M.** Häufigkeitsverteilung der Schädigungsgrade in *Pax6-Norrin*- und Wildtypmäusen. *Pax6-Norrin*-Tiere zeigen deutlich häufiger eine milde Ausprägung der Sehnervenschädigung als ihre wildtypischen Geschwistertiere. Zusätzlich ist die Häufigkeit einer starken Schädigung der *Nn. optici* in den transgenen Tieren gegenüber den Kontrolltieren geringer. Das Auftreten einer als moderat eingestuften Schädigung ist in beiden Versuchsgruppen annähernd gleich. **N.** Quantitative Bestimmung der Gesamtanzahl der Axone in den *Nn. optici* von *Pax6-Norrin*-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren. *Pax6-Norrin*-Tiere zeigen eine signifikant höhere Anzahl von Axonen im Sehnerv im Vergleich zu wildtypischen Vergleichstieren. Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ .

Die Einteilung des Schädigungsgrades der *Nn. optici* erfolgte in Anlehnung an die von Anderson und Libby *et al.* beschriebene Klassifizierung (vgl. Abb. 23 A-L). Eine milde Ausprägung lag vor, wenn die einzelnen Axone weitgehend dicht nebeneinander im Sehnerv vorlagen und keine oder nur wenig dunkel gefärbte Myelinscheiden erkennbar waren. Die dunkle Färbung ist dabei auf degenerierende Myelinscheiden zurückzuführen und ist ein Hinweis auf die Schädigung der Axone. Moderat geschädigte Sehnerven hingegen zeichnen sich durch eine verminderte Axonzahl, einer höheren Anzahl von geschädigten Axonen und dem Auftreten größerer glialer Narbenflächen aus. Diese entstehen, wenn die Areale der degenerierenden Sehnervenaxone durch Gliazellen ersetzt werden. Wiesen *Nn. optici* großflächige gliale Vernarbungen im Zusammenhang mit einer stark reduzierten Axonzahl und einem hohen Anteil geschädigter Axone auf, wurde der Schädigungsgrad als stark eingestuft. Im Vergleich zu wildtypische DBA/2J-Tiere (43,5 %) wiesen mit 69,6 % *Pax6-Norrin*-Mäuse einen deutlich höheren Anteil mild ausgeprägter *Nn. optici* auf (vgl. Abb. 23, M). Die Anzahl als moderat beurteilter Sehnerven war hingegen in Wildtyp-Kontrolltieren und Norrin-überexprimierenden Mäusen vergleichbar. So zeigten 13,0 % der wildtypischen und 8,7 % der transgenen Versuchstiere eine mittelschwere Schädigung. Stark geschädigte Sehnerven konnten in wiederum in 43,5% der Wildtypmäuse und nur in 21,7% der *Pax6-Norrin*-Tiere beobachtet werden. Zur exakteren Quantifizierung der RGC-Degeneration wurde schließlich die Axonanzahl in den jeweiligen Sehnerven bestimmt (vgl. Abb. 23 N). Wildtyp-DBA2J-Mäuse wiesen durchschnittlich eine Anzahl von  $34894,87 \pm 3252,55$  Axone auf. Im Vergleich dazu war in *Pax6-Norrin*-Tieren mit durchschnittlich

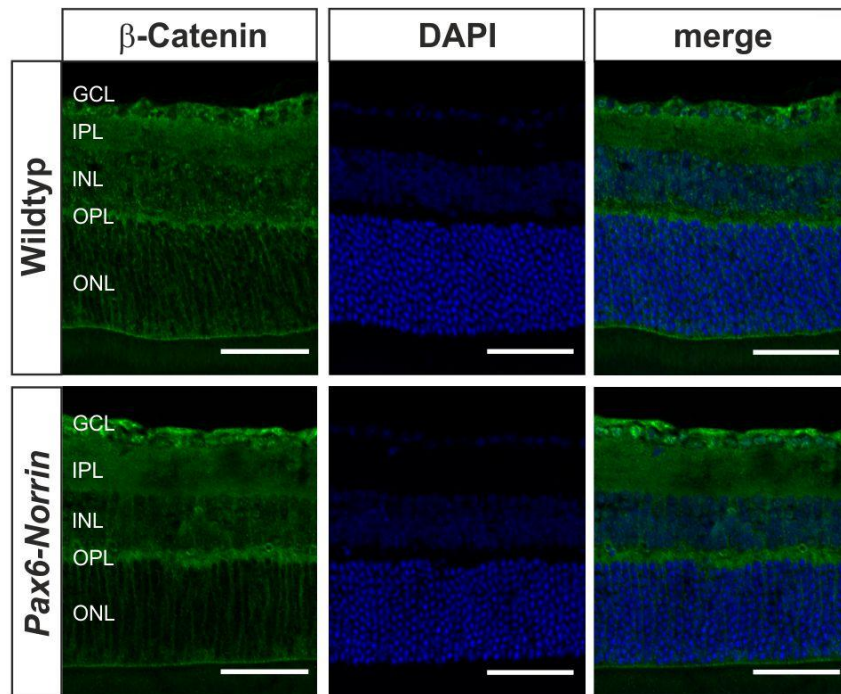
43722,34  $\pm$  3010,65 die Zahl der Axone im Sehnerv signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht. Zusammenfassend weisen die erhobenen Daten deutlich darauf hin, dass Norrin in DBA/2J Mäusen die Degeneration des vorderen Augenabschnitts und hierdurch den IOD sowie den Verlust von RGC deutlich vermindern kann.

### **3.2.4 Norrin aktiviert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Retinae von DBA/2J-Mäusen**

Durch eine Bindung an Fzd4 und LRP5 aktiviert Norrin den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, wodurch es zu einer Akkumulation und anschließenden Translokation von  $\beta$ -Catenin in die Zellkerne kommt (MacDonald *et al.*, 2009). Um zu überprüfen, ob und in welchen Geweben Norrin in DBA/2J-Mäusen den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert, wurden immunhistochemische Färbungen für  $\beta$ -Catenin von Augen zwei Monate alter Tiere durchgeführt. Die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in den transgenen FVB-N-Mäusen wurde bereits von Ludwig Zeilbeck im Rahmen seiner Doktorarbeit anhand von Western Blot Analysen und immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen.

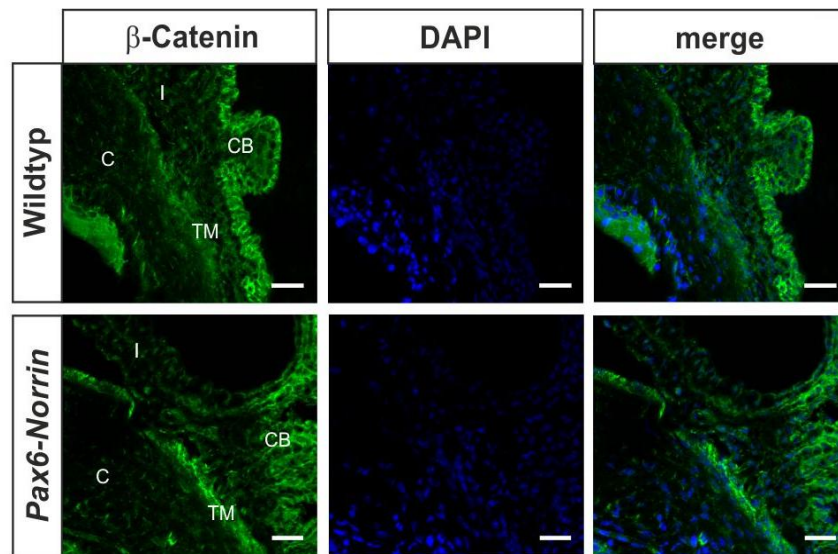
Immunhistochemische  $\beta$ -Catenin-Färbungen der Netzhaut von wildtypischen DBA/2J Mäusen zeigen lediglich ein schwaches positives Signal in der RGC-Schicht und der inneren Körnerschicht. Demgegenüber ist die Färbung in transgenen *Pax6-Norrin*-Tieren in der inneren Netzhaut deutlich intensiver. Zusätzlich finden sich im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen in dieser Schicht zahlreiche  $\beta$ -Catenin positive Zellkerne, was deutlich auf eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in den transgenen Mäusen hindeutet (vgl. Abb. 24). Da *Pax6-Norrin*-Versuchstiere im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen einen niedrigeren Augeninnendruck (s. 3.2.1) und eine weniger stark ausgeprägte Pathologie des Kammerwinkels aufweisen (s. 3.2.), wurde der Frage nachgegangen, ob ein Teil des sekretierten Norrins durch den Glaskörper in den vorderen Abschnitt des Auges diffundiert und dort ebenfalls den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert. Um zu überprüfen, ob auch in den Kammerwinkeln von *Pax6-Norrin*-Mäusen eine verstärkte Akkumulation von  $\beta$ -Catenin zu beobachten ist, wurden die mit anti- $\beta$ -Catenin-Antikörpern gefärbten Gefrierschnitte auch im Bereich der Augenvorderkammern untersucht (vgl. Abb. 25). Im direkten Vergleich weisen *Pax6-Norrin*-Tiere ein deutlicheres Signal für  $\beta$ -Catenin

im Trabekelwerk auf als ihre wildtypischen Geschwister, welche nur eine schwache Grundfärbung für das ubiquitär vorliegende  $\beta$ -Catenin zeigen.



**Abbildung 24: Norrin aktiviert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in den Neuronen der inneren Netzhaut von DBA/2J Mäusen**

Immunhistologische  $\beta$ -Catenin-Färbung von Gefrierschnitten der Retina zwei Monate alter *Pax6-Norrin*-Mäuse und Wildtyp-Geschwistertieren. Im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren zeigen *Pax6-Norrin*-Mäuse ein verstärktes Signal für  $\beta$ -Catenin (grün) in den Zellkernen der retinalen Ganglienzellschicht und zum Teil in der inneren Körnerschicht. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.



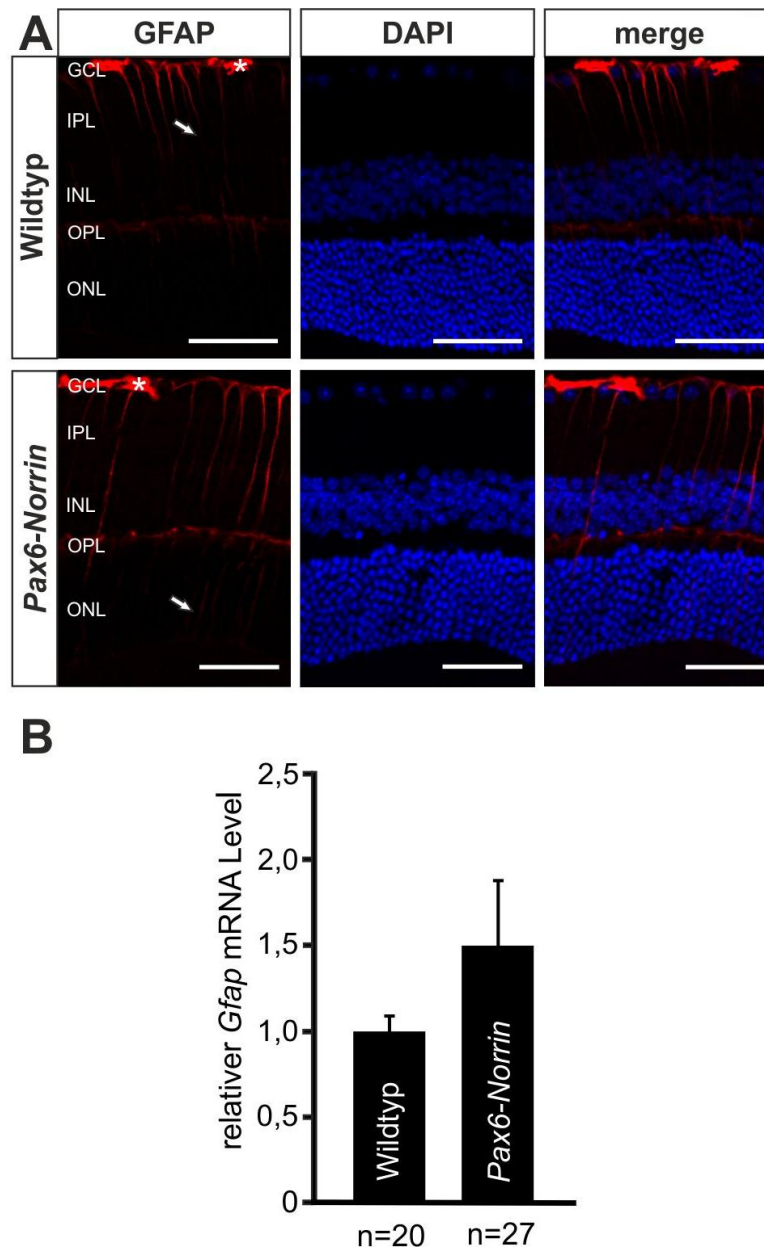
**Abbildung 25: Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Trabelwerk von *Pax6-Norrin*-Mäusen**

Immunhistologische  $\beta$ -Catenin-Färbung von Gefrierschnitten des Kammerwinkels zwei Monate alter *Pax6-Norrin*-Mäuse und Wildtyp-Vergleichstieren. *Pax6-Norrin*-Tiere zeigen eine intensivere Färbung für  $\beta$ -Catenin (grün) im Trabekelwerk verglichen mit wildtypischen Geschwistertieren. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. I = Iris, CB = Ziliarkörper, C= Cornea, TM = Trabekelwerk. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

### 3.2.5 Untersuchung der Gliosereaktion

Da in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass Norrin seine neuroprotektiven Eigenschaften über eine gesteigerte Gliosereaktion von Müllerzellen vermittelt (Seitz *et al.*, 2010), wurde untersucht, ob dies auch im Modell der chronischen Degeneration von retinalen Ganglienzellen der Fall ist. Im Rahmen der Gliosereaktion kommt es regelmäßig zu einer gesteigerten Expression von *Gfap* (Glial fibrillary acidic protein), welches aus diesem Grund als gängiger Marker für aktivierte Müllerzellen gilt (Lewis & Fisher, 2003). Da die neuroprotektiven Mechanismen deutlich vor den degenerativen Veränderungen aktiviert werden müssen, wurde die Gliosereaktion an zwei Monate alten Versuchstieren mittels immunhistochemische Färbung und quantitativer real-time RT-PCR für *Gfap* untersucht.





**Abbildung 26: Pax6-Norrin-Mäuse zeigen stärkere Gliosereaktion als vergleichbare Wildtyp-tiere**  
**A.** Immunhistologische GFAP-Färbung von Gefrierschnitten der Retina zwei Monate alter *Pax6-Norrin*-Mäuse und wildtypischen Geschwistertieren. Bereits in zwei Monate alten Wildtypmäusen ist eine Aktivierung der Müllerzellen anhand der radialen Färbung für GFAP, die von der RGC- bis in die innere plexiforme Schicht hineinragt, zu beobachten. In *Pax6-Norrin*-Tieren wurde eine ähnliche Färbung für GFAP beobachtet, allerdings reichen die radialen Ausläufer zum Teil bis in die äußere Körnerschicht. Rot: GFAP, blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m. **B.** Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Gfap* mRNA Expression in den Retinae von zwei Monaten alten *Pax6-Norrin*-Mäusen und wildtypischen Kontrolltieren. Im Vergleich zu Wildtyp-tieren weisen *Pax6-Norrin*-Tiere eine tendenziell höhere *Gfap* Expressionslevel auf. Mittelwert  $\pm$  SEM.

In der Netzhaut färben sich unter physiologischen Bedingungen lediglich Astrozyten, die in der RGC-Schicht lokalisiert sind. Im Rahmen einer Gliosereaktion beginnen auch Müllerzellen mit einer *Gfap*-Expression, die sich als radiale Färbung in der

Netzhaut darstellt. In *Pax6-Norrin*-Mäusen als auch in wildtypischen Kontrolltieren findet sich eine deutliche Färbung in der inneren Netzhaut, welche mit der Lokalisation von Astrozyten vereinbar ist (vgl. Abb. 26 A). Zusätzlich kann in wildtypischen Kontrollen bereits im Alter von zwei Monaten eine radiale, streifige Färbung für GFAP, die bis in die innere plexiforme Schicht reicht, beobachtet werden. Ein ähnlicher Befund zeigt sich auch in transgenen *Pax6-Norrin*-Mäusen, allerdings reichen die radialen Ausläufer in diesen Tieren teilweise bis in die äußere Körnerschicht hinein und deuten eine auf eine verstärkte Gliosereaktion in transgenen Tieren hin.

In Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Färbungen kann auch eine verstärkte Expression von *Gfap* in transgenen Versuchstieren beobachtet werden (vgl. Abb. 26 B). Retinae von *Pax6-Norrin*-Mäusen weisen 1,5-fach höhere *Gfap* mRNA-Spiegel auf als die ihrer wildtypischen Geschwistertiere.

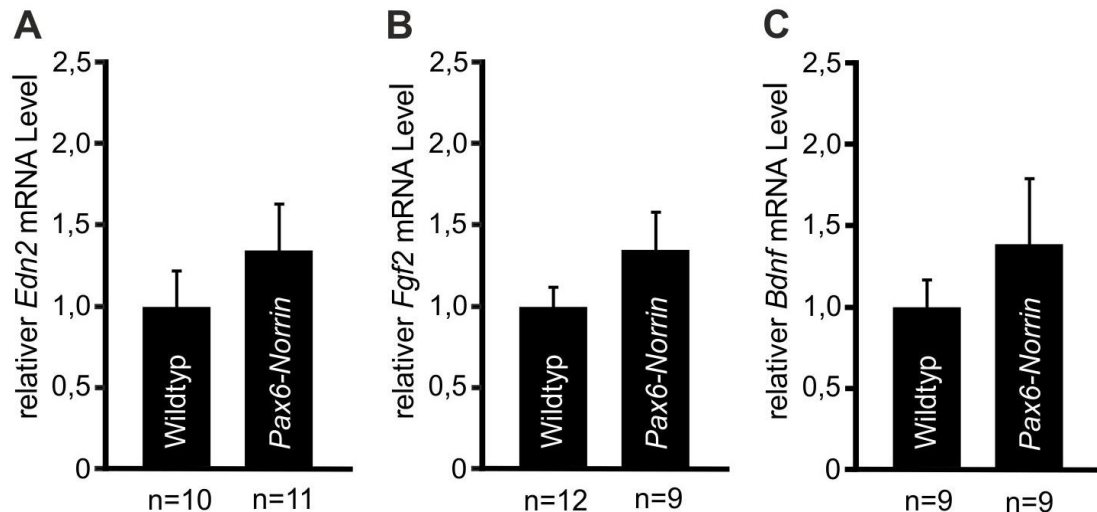
### 3.2.6 Expression neuroprotektiver Faktoren

Da die Gliosereaktion von Müllerzellen in einer gesteigerten Expression von neuroprotektiven Faktoren münden kann (Bringmann 2009), wurden, wie auch zuvor im akuten NMDA-Schadensmodell, die mRNA-Level von *Lif*, *Edn2*, *Bdnf*, *Igf1* und *Fgf2* mittels real-time RT-PCR Analyse untersucht.

Im Gegensatz zu einer akuten Schädigung von RGCs durch NMDA (s. 3.1.2) konnte weder in *Pax6-Norrin*-Tieren noch in DBA/2J-Wildtypmäusen *Lif* mRNA detektiert werden (WT: n = 16, TG: n = 16).

Unabhängig von diesen Ergebnissen konnten *Edn2* und *Fgf2* mRNA-Level in einigen der verwendeten Versuchstiere nachgewiesen werden. Ein deutlicher Unterschied der mRNA-Expression zwischen *Pax6-Norrin*-Mäusen und ihren wildtypischen Geschwistertieren fand sich allerdings nicht (vgl. Abb. 27 A und B). Analysen der *Bdnf*-Expression zeigen ein vergleichbares Resultat. So weisen *Pax6-Norrin*-Mäuse diskrete, nicht signifikante, 1,4-fach höhere *Bdnf* mRNA-Level auf als vergleichbare Wildtyp-Kontrolltiere (vgl. Abb. 27 C).

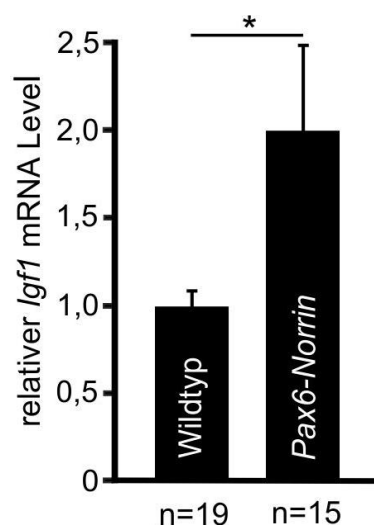




**Abbildung 27: Pax6-Norrin-Mäuse weisen nur eine geringfügig höhere *Edn2*, *Fgf2* und *Bdnf* Expression auf als Wildtyp-Geschwistertiere**

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Edn2* (A), *Fgf2* (B) und *Bdnf* (C) mRNA Expression in den Retinae von zwei Monaten alten *Pax6-Norrin*-Mäusen und Wildtyp-Tieren. Im Vergleich zu wildtypischen Mäusen zeigen transgene Versuchstiere nur leicht erhöhte mRNA-Level für *Edn2*, *Fgf2* und *Bdnf*. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Faktoren konnte jedoch ein robustes Signal für *Igf1* mRNA in der real-time RT-PCR beobachtet werden. Tiere, welche eine Norrin-Überexpression in der Netzhaut aufwiesen, zeigten eine signifikante, um ca. das 2-fache erhöhte *Igf1*-Expression als vergleichbare Wildtypmäuse (vgl. Abb. 28).

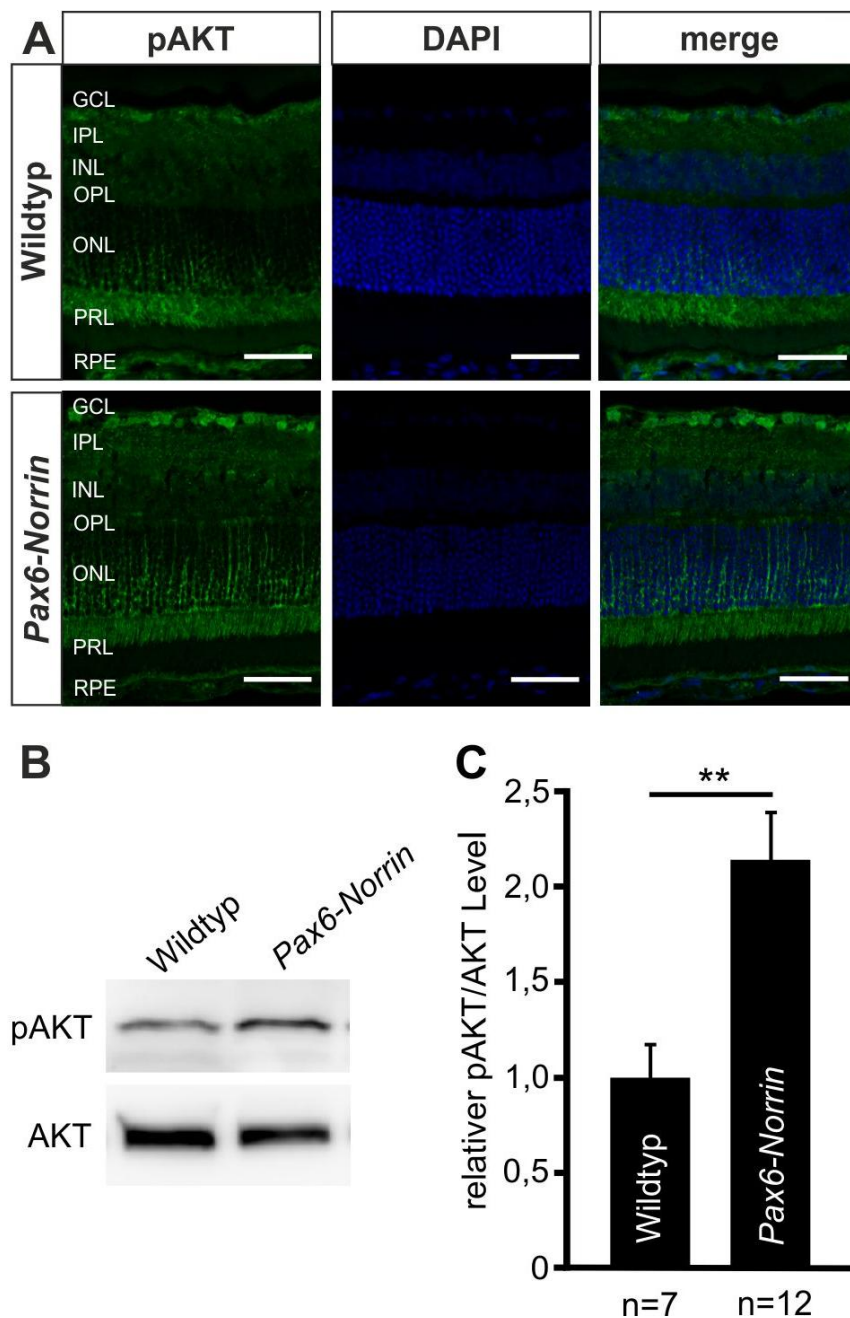


**Abbildung 28: Norrin induziert die Expression von *Igf1* mRNA in Pax6-Norrin-Mäusen**

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Igf1* mRNA Expression in den Retinae von zwei Monaten alten *Pax6-Norrin*-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren. Transgene Versuchstiere zeigen gegen über Wildtypmäusen eine deutlich gesteigerte *Igf1*-Expressionsrate. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

### 3.2.7 Aktivierung des pAKT-Signalwegs

Aufgrund der Tatsache, dass die *Igf1*-Expressionslevel in *Pax6-Norrin*-Mäusen signifikant erhöht sind und IGF1 ein potenter Aktivator des AKT-Signalwegs ist (Dudek *et al.*, 1997; Brunet *et al.*, 2001), wurden die pAKT-Proteinlevel in zwei Monate alten *Pax6-Norrin*-Mäusen und entsprechenden Wildtyptieren untersucht. Dies erfolgte mittels immunhistochemischer Färbung und Western Blot Analysen.



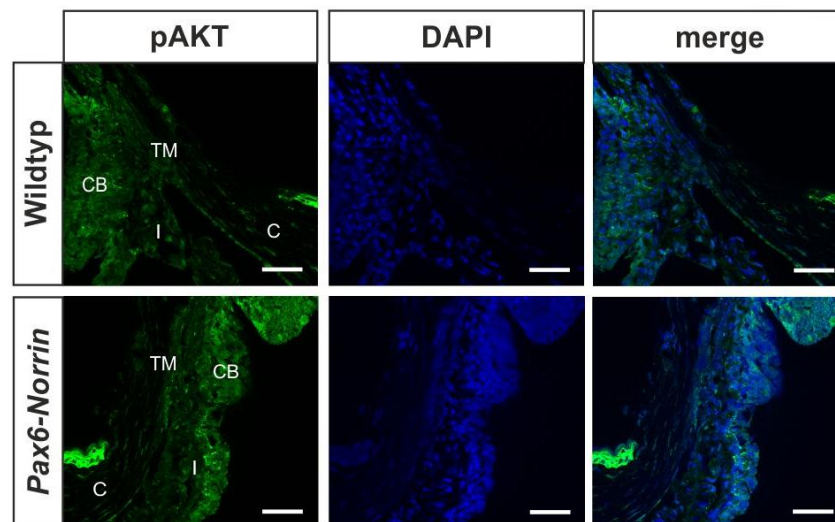
**Abbildung 29: Norrin aktiviert AKT-Signalweg in DBA/2J Tieren in Neuronen der inneren Retina**

**A.** Immunhistologische pAKT-Färbung von Gefrierschnitten der Retina zwei Monate alter *Pax6-Norrin*-Mäuse und wildtypischen Geschwistertieren. Im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren weisen *Pax6-Norrin*-Mäuse eine deutlich intensivere Färbung für pAKT (grün) in den Zellkernen der retinalen Ganglienzellen und in der plexiformen Schicht auf. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht, PRL = Photorezeptorschicht, RPE = retinales Pigmentepithel. Maßstabsbalken: 50 µm. **B, C.** Western Blot Analysen (**B**) und densitometrische Auswertung (**C**) der relativen pAKT-Level im retinalen Gesamtprotein von 2 Monaten alten *Pax6-Norrin*- und Wildtypmäusen. *Pax6-Norrin*-Mäuse weisen gegenüber wildtypischen Vergleichstieren einen signifikant höheren pAKT-Spiegel auf. Mittelwert ± SEM. \*\*p<0,01.

In wildtypischen Kontrolltieren konnte ein spezifisches Signal für pAKT in der Schicht der äußeren Körnerschicht sowie, wenn gleich deutlich schwächer, in der RGC-Schicht beobachtet werden. Im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen zeigen transgene *Pax6-Norrin*-Tiere nur eine geringfügig stärkere Färbung für pAKT in der äußeren Körnerschicht. Demgegenüber ist das Signal für pAKT in transgenen Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen deutlich stärker in der RGC-Schicht (vgl. Abb. 29 A). Zusätzlich konnte in *Pax6-Norrin*-Tieren eine nukleäre Lokalisation von pAKT in der inneren Körnerschicht beobachtet werden. Die histologischen Befunde konnten insgesamt durch Western Blot Analysen bestätigt werden. Die Western Blot Analyse für pAKT zeigte eine deutliche, spezifische Bande im retinalen Gesamtprotein von Kontrolltieren (vgl. Abb. 29 B). Im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren war das Signal für pAKT in Retinae von transgenen *Pax6-Norrin*-Mäusen deutlich stärker. Die densitometrische Auswertung der AKT- und pAKT-Signale zeigt einen hochsignifikanten ( $p<0,01$ ) Anstieg der relativen pAKT/AKT-Level in transgenen *Pax6-Norrin*-Mäusen auf das 2,1-fache des wildtypischen Vergleichswerts (vgl. Abb. 29 C). Eine Überexpression von Norrin führt somit zu einer Aktivierung des AKT-Signalwegs in DBA/2J-Mäusen.

Da IGF1 ein sezerniertes Protein ist und die histologischen Analysen darauf hindeuten, dass in *Pax6-Norrin*-Mäusen die Kammerwinkelpathologie geringer ausgeprägt ist, wurde anhand von immunhistologischen Färbungen der Frage nachgegangen, ob die Norrin-vermittelte *Igf1*-Expression auch die vordere Augenkammer beeinflussen kann. Die Färbungen des Kammerwinkels für pAKT zeigen nur eine unspezifische Hintergrundsfluoreszenz im Bereich des Trabekelwerks von wildtypischen Kontrolltieren (vgl. Abb. 30). Im Vergleich zu diesen Mäusen fand sich bei transgenen *Pax6-Norrin*-Mäusen ein diskret stärkeres Signal

im Trabekelwerk, so dass nicht von einer gesteigerten Aktivierung des AKT-Signalwegs im Trabekelwerk von transgenen Tieren ausgegangen werden kann.



**Abbildung 30: Überexpression von Norrin in der Netzhaut führt nicht zur Aktivierung von AKT im Trabelwerk**

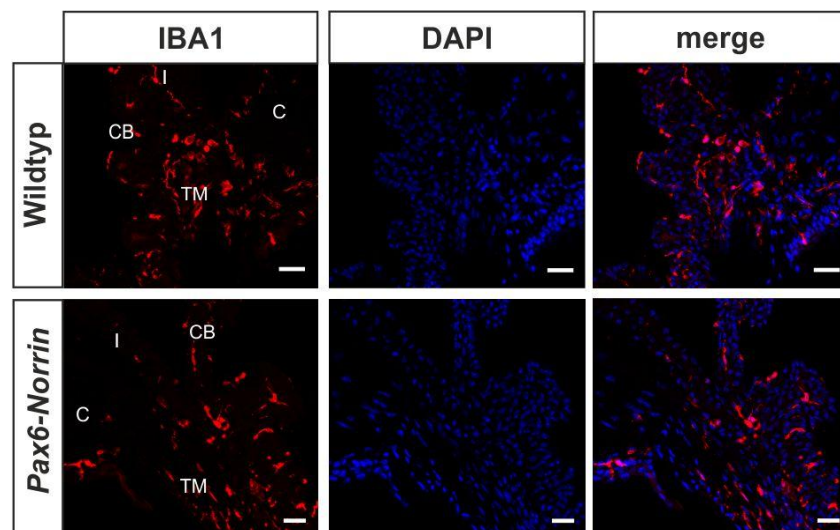
Immunhistologische pAKT-Färbung des Kammerwinkels von zwei Monate alten *Pax6-Norrin*-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren. *Pax6-Norrin*-Tiere weisen gegenüber wildtypischen Vergleichstieren nur ein sehr diskret stärkeres Signal für pAKT (grün) im Trabekelwerk auf. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. I = Iris, CB = Ziliarkörper, C = Cornea, TM = Trabekelwerk. Maßstabsbalken: 20 µm.

### 3.2.8 Einfluss auf immunologische Prozesse

DBA/2J-Mäuse entwickeln im Laufe ihres Lebens ein Dispersionsglaukom. Die aus der Iris freigesetzten Pigmentpartikel werden von phagozytierenden Makrophagen aufgenommen, die auf Entzündungsprozesse reagieren und hierdurch vermehrt in die betroffene Region einwandern (John *et al.*, 1998; Mo *et al.*, 2003). Da das Auftreten von vorderen Synechien in den DBA/2J-Mäusen möglicherweise ein Resultat einer überschießenden Immunreaktion darstellt (John *et al.*, 1998; Libby *et al.*, 2005c) und *Pax6-Norrin*-Mäuse weniger stark ausgeprägte Synechien ausbilden, wurde untersucht, ob die transgene Überexpression von Norrin die Entzündungsreaktion im vorderen Augenabschnitt von DBA/2J Mäusen beeinflussen kann. Da in der Makrophagen-vermittelten Entzündungsreaktion die Expression von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ) und induzierter Stickstoffmonooxid-Synthase (*iNOS*) eine entscheidende Rolle spielt (Laskin, 2009), wurden von *Pax6-Norrin*-Mäusen

immunhistochemische Färbungen für IBA1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1), einem Marker für Makrophagen und Mikrogliazellen (Ohsawa *et al.*, 2004), angefertigt und die retinalen mRNA-Spiegel für *TNF $\alpha$*  sowie *iNOS* mittels real-time RT-PCR bestimmt.

Im Trabekelwerk von zwei Monate alten Wildtypmäusen fand sich in der Immunfluoreszenz-Färbung eine hohe Anzahl von IBA1-positiven Zellen (vgl. Abb. 31). Im Gegensatz dazu weisen transgene *Pax6-Norrin*-Geschwistertiere deutlich weniger Makrophagen im Trabekelwerk auf, was darauf hinweist, dass Norrin das Einwandern und hierdurch die immunologische Prozesse im Kammerwinkel von DBA/2J Mäusen abmildern könnte.



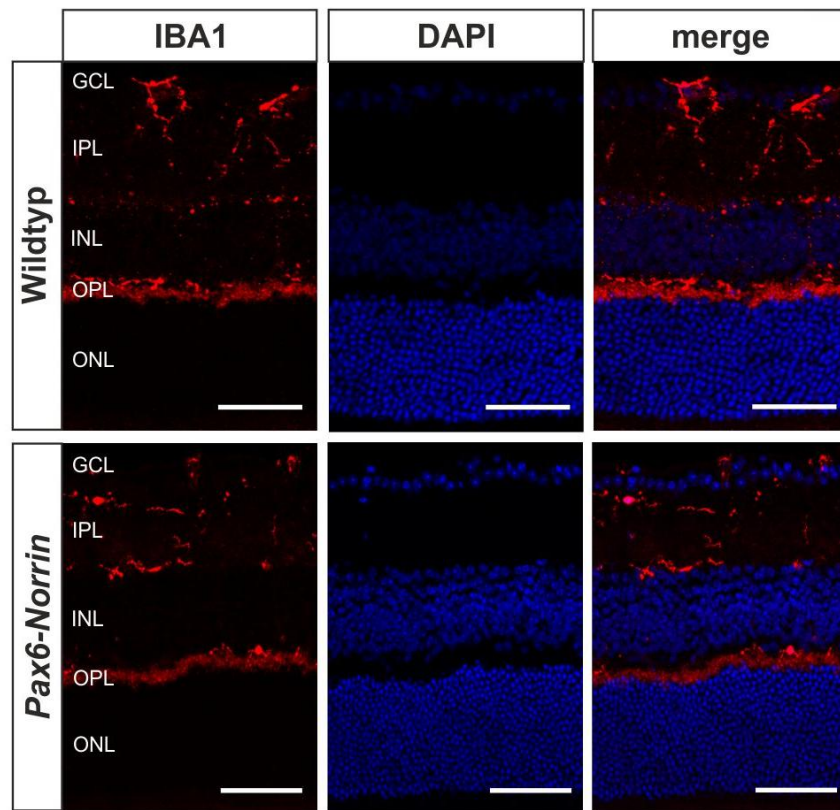
**Abbildung 31: Norrin vermindert das Einwandern von Makrophagen in das Trabekelwerk**

Immunhistologische IBA1-Färbung des Kammerwinkels zwei Monate alter *Pax6-Norrin*-Mäuse und Wildtyp-Kontrolltiere. Im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren weisen *Pax6-Norrin*-Mäuse weniger IBA1-positive Zellen (rot) im Trabekelwerk auf. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. I = Iris, CB = Ziliarkörper, C = Cornea, TM = Trabekelwerk. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Weiterhin wurde auch die Netzhaut von transgenen DBA/2J Mäusen bezüglich möglicher Veränderungen der Makrophagen-Anzahl untersucht (vgl. Abb. 32). In wildtypischen Kontrolltieren wie auch transgenen *Pax6-Norrin*-Mäusen zeigte sich in sagittalen Gefrierschnitten eine Vielzahl von sternförmigen IBA1-positiven Zellen. Ein Unterschied in der Verteilung und der Anzahl der Zellen zwischen *Pax6-Norrin*-Tieren und wildtypischen Kontrollmäusen fand sich nicht. Insgesamt deuten die erhobenen Befunde daraufhin, dass Norrin die inflammatorischen Prozesse im Trabekelwerk



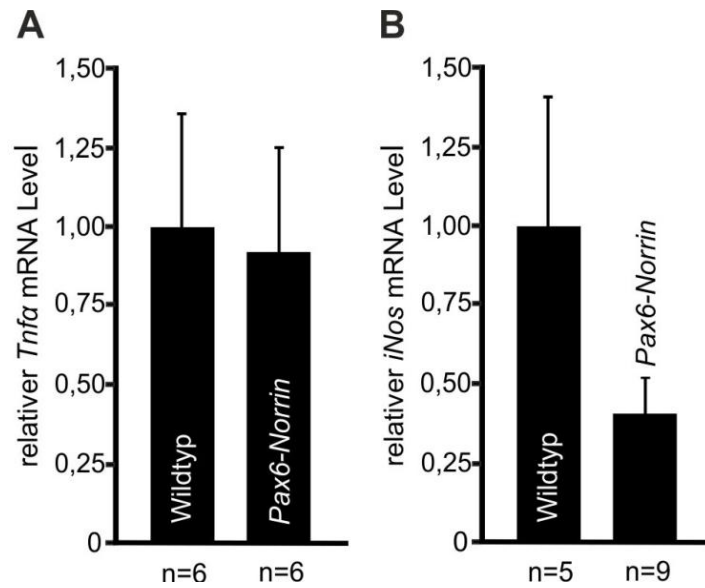
vermindern kann, diese allerdings in der Netzhaut von zwei Monate alten DBA/2J Mäusen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.



**Abbildung 32: Norrin zeigt keinen Einfluss auf die Makrophagen der Retina zwei Monate alter DBA/2J Mäuse**

Immunhistologische IBA1-Färbung von Gefrierschnitten der Retina von zwei Monate alten *Pax6-Norrin*-Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren. *Pax6-Norrin*-Mäuse zeigen eine vergleichbare Morphologie und Häufigkeit von IBA1-positiven Zellen (rot) wie wildtypische Kontrolltiere. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Nachdem immunhistochemische Färbungen erste Hinweis auf eine Norrin-vermittelte Modulation der Entzündungsreaktion im Trabekelwerk lieferten, wurde die mRNA Expression von *Tnfa* und *iNos* in der Netzhaut von transgenen *Pax6-Norrin*-Mäusen mittels real-time RT-PCR untersucht. (vgl. Abb. 33 A und B). So zeigen *Pax6-Norrin*-Mäuse und Wildtyp-Geschwistertiere zwar vergleichbare *Tnfa* mRNA Level, jedoch ist die Expression von *iNos* in transgenen Tieren deutlich gegenüber Wildtypmäusen reduziert. *Pax6-Norrin*-Mäuse weisen 0,6-fach niedrigere *iNos* mRNA-Spiegel auf. Somit könnte Norrin in DBA/2J-Mäusen möglicherweise über eine Reduktion von iNOS die Immunreaktionen im Auge reduzieren.



**Abbildung 33: Expression immunologisch aktiver Faktoren in der Netzhaut von *Pax6-Norrin*- und DBA/2J-Wildtypmäusen**

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der *Tnfa* (A) und *iNos* (B) mRNA Expression in den Retinae von zwei Monaten alten *Pax6-Norrin*-Mäusen und vergleichbaren Wildtyp-Kontrolltieren. Im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigen *Pax6-Norrin*-Tiere keinen Unterschied bezüglich der *Tnfa*-Expression, jedoch deutlich niedriger *iNos* mRNA-Spiegel. Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Einfluss von Norrin auf akut geschädigte Ganglienzellen im NMDA-Modell

Eine neuroprotektive Wirkung von Norrin *in vivo* konnte erstmals durch Seitz *et al.* nachgewiesen werden (Seitz *et al.*, 2010). Dabei wurde untersucht, ob eine zusätzliche Injektion von Norrin eine schützende Wirkung auf retinale Ganglienzellen ausübt, die mittels NMDA exzitatorisch geschädigt wurden (Seitz *et al.*, 2010). Augen, welche durch eine Kombination aus NMDA und Norrin behandelt wurden, zeigten eine signifikant niedrigere Apoptoserate von retinalen Neuronen in der Ganglienzellschicht der Retina und eine erhöhte Anzahl von RGC-Axonon im Sehnerv als ausschließlich NMDA-behandelte Kontrollaugen (Seitz *et al.*, 2010). Da dies mit einer erhöhten Expression von *Lif* (Leukemia inhibitory factor), *Edn2* (Endothelin 2), *Fgf2* (Fibroblast growth factor 2), *Bdnf* (Brain-derived neurotrophic factor) und *Gfap* (Glial fibrillary acidic protein) einherging, wurde folgender Wirkmechanismus für die Vermittlung des neuroprotektiven Effekts auf retinale Ganglienzellen postuliert: Norrin aktiviert durch Bindung an die Fzd4-Rezeptoren den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Müllerzellen, wodurch es zu einer Sekretion von LIF kommt. Dies hat eine erhöhte Sekretion von EDN2 durch geschädigte retinalen Ganglienzellen oder Photorezeptoren zur Folge, was wiederum zu einer weiteren Steigerung der *Lif* Expression in Müllerzellen führt. Neben dieser positiven Rückkopplung kommt es dabei zu einer zusätzlichen Induktion von neurotrophen Wachstumsfaktoren wie FGF2 und BDNF, die letztlich eine anti-apoptotische Wirkung auf die retinalen Ganglienzellen ausüben (Seitz *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte überprüft werden, ob Norrin seine neuroprotektive Wirkung auf akut geschädigte Ganglienzellen über diesen Weg vermittelt und welchen Stellenwert LIF in diesem Mechanismus einnimmt. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen von NMDA und Norrin auf Augen LIF-defizienter Mäuse analysiert.

Zu Beginn der Untersuchung wurde das Mausmodell morphologisch und molekularbiologisch charakterisiert. Der Phänotyp der *Lif*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigte weder in den Retinae noch in den Sehnerven Unterschiede zu denen wildtypischer Geschwistertiere. Aufbau und Zellzahl der retinalen Schichten als auch Dichte und Aussehen der Axone im Sehnerv entsprachen demjenigen gesunder Wildtypiere.



Dies korreliert mit früheren Beobachtungen, die Joly *et al.* für sechs Wochen alte *Lif*<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäuse machen konnten (Joly *et al.*, 2008) und gestattete die Verwendung dieser Tiere für die geplanten Untersuchungen. Weiterhin wurden die *Lif* mRNA-Level analysiert, die im Vergleich von heterozygoten Tieren zu Wildtypmäusen ca. um die Hälfte reduziert und in homozygoten LIF-defizienten Mäusen nicht nachweisbar waren. Durch diese Untersuchung konnte bestätigt werden, dass es sich bei den verwendeten Tieren tatsächlich um LIF-defiziente Tiere handelt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das verwendete Norrin die *Lif* Expression in den injizierten Augen von wildtypischen Kontrollen induzieren kann. In untersuchten Wildtypmäusen konnte eine vergleichbare Steigerung der *Lif* Expression nach Gabe von NMDA bzw. NMDA/Norrin beobachtet werden, wie sie bereits von Seitz *et al.* beschrieben wurde. In beiden Studien stieg die Expression von *Lif* nach NMDA-Injektion stark an und konnte durch zusätzliche Behandlung mit Norrin um das 1,6-fache (Seitz *et al.*, 2010) bzw. 1,8-fache gesteigert werden. Die ermittelten relativen mRNA-Level der aktuellen Arbeit sind jedoch weit höher als in den vorangegangenen Experimenten, was durch geringfügige Schwankungen der *Lif* Expressionslevel in PBS-injizierten Augen, welche als Bezugswerte dienten, und durch die leichte Induzierbarkeit von LIF erklärt werden kann. Starke Expressionssteigerungen wie sie in den vorliegenden Daten zu sehen sind, konnten auch für andere Untersuchungen gezeigt werden. So wiesen *Rpe65-Norrin*-Mäuse eine 40-fach höhere und Wildtyp-Mäuse eine 125-fach höhere Expression von *Lif* nach Licht-induzierter Photorezeptorschädigung auf (Braunger *et al.*, 2013). Insgesamt zeigen die beschriebenen Experimente, dass das Mausmodell der LIF-Defizienz für die vorliegende Studie geeignet und das verwendete Norrin eine ausreichende Bioaktivität aufwies.

Der Einfluss von LIF auf die Norrin-vermittelte Neuroprotektion von retinalen Ganglienzellen wurde durch Quantifizierung der apoptotischen Zellen in der Retina nach Injektion von NMDA oder NMDA und Norrin analysiert. NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) ist ein synthetisches Glutamat-Analogon und kann durch exzitatorische Schädigung den apoptotischen Zelltod verursachen (Slaughter, 2010). Durch Bindung von NMDA an die physiologischen NMDA-Rezeptoren retinaler Ganglienzellen und Amakrinzellen kommt es zu einem massiven Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle, was eine Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden zur Folge hat (Li *et al.*, 1999; Lipton, 2006; Shen *et al.*, 2006). Dem entsprechend konnte in Retinae, die mit

NMDA behandelt wurden eine deutlich höhere Anzahl apoptotischer Zellen beobachtet werden als dies in PBS-injizierten Augen der Fall war. Eine kombinierte Gabe von NMDA und Norrin führte in Wildtypmäusen sowohl in der Ganglienzellschicht und als auch in der inneren Körnerschicht zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate, was eine gleichermaßen neuroprotektive Wirkung auf retinale Ganglienzellen und Amakrinzellen aufzeigt. Im Gegensatz dazu konnte in LIF-defizienten Tieren keine Abnahme der Apoptoserate nach NMDA/Norrin-Injektion beobachtet werden. Die Anwesenheit von LIF scheint somit essentiell für die Vermittlung des neuroprotektiven Effekts von Norrin zu sein. Interessanterweise ist die Anzahl apoptotischer Zellen in heterozygoten Tieren höher als in homozygoten LIF-defizienten Mäusen. Während eine Reduktion von LIF zu einer höheren Anfälligkeit gegenüber exzitatorischer Schädigung zu führen scheint, hat ein vollständiger Mangel an LIF augenscheinlich keine Auswirkung bzw. sogar eine schützende Wirkung darauf. Die Anzahl apoptotischer Amakrinzellen nach NMDA-Behandlung liegt in *Lif*<sup>-/-</sup>-Tieren deutlich niedriger als in wildtypischen Mäusen. Möglicherweise hat eine vollständige Abwesenheit von LIF eine Aktivierung alternativer Schutzmechanismen zur Folge, die sich auf amakrine Zellen nicht jedoch auf retinale Ganglienzellen auswirken. Aufgrund der Tatsache, dass LIF-defiziente Mäuse tendenziell höhere *Igf1* Expressionlevel als vergleichbare Wildtypiere aufwiesen, ist eine Induktion von IGF1 in diesem Zusammenhang denkbar. Da der Fokus der Doktorarbeit jedoch auf dem Schutz retinaler Ganglienzellen lag, wurde diese Fragestellung im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter verfolgt.

Der postulierte Wirkmechanismus impliziert neben einer Reihe von neuroprotektiven Faktoren auch eine Interaktion zwischen geschädigten retinalen Ganglienzellen bzw. Photorezeptoren und Müllerzellen. Im aktivierten Zustand exprimieren Müllerzellen erhöhte Mengen an *Gfap* (Glial fibrillary acidic protein), weshalb es als Marker für die Gliosereaktion genutzt werden kann (Lewis & Fisher, 2003). Frühere Untersuchungen an *Lif*<sup>-/-</sup>- Mäusen zeigten gegenüber Wildtyp- bzw. *Lif*<sup>+/-</sup>- Mäusen stark reduzierte *Gfap* mRNA-Level, was auf eine LIF-abhängige Müllerzellgliose schließen lässt (Joly *et al.*, 2008; Bürgi *et al.*, 2009). Auch dass sich eine erhöhte *Gfap* Expression durch zusätzliche Applikation von Norrin noch weiter steigern lässt, spricht für einen positiven Zusammenhang zwischen LIF-Sekretion und Aktivierungsgrad (Seitz *et al.*, 2010). Immunhistologische Färbungen sagittaler Augenschnitte von wildtypischen und LIF-defizienten Mäusen nach PBS-, NMDA-

und NMDA/Norrin-Behandlung zeigten jedoch kein nennenswertes GFAP-Signal in Müllerzellen. Dass dies nicht auf einen Fehler im Färbeprozess zurückgeführt werden kann, ist an der intensiven und über die Untersuchungsgruppen gleichverteilten Färbung der Astrozyten, welche sich oberhalb der retinalen Ganglienzellen befinden, erkennbar. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde die mRNA Expression von *Gfap* in den verschiedenen Versuchsgruppen ermittelt. Durch die sensitivere Methode konnte eine LIF-Abhängigkeit der *Gfap* Expression bestätigt werden. Sowohl in Wildtypkontrolltieren als auch in *Lif<sup>-/-</sup>*- Mäusen stiegen die mRNA-Level von *Gfap* nach NMDA-Injektion und kombinierte NMDA/Norrin-Behandlung an. *Lif<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigten hingegen nur basale *Gfap*-Spiegel, die sich nur minimal durch die unterschiedlichen Injektionen beeinflussen ließen. Dass dies nicht auf eine möglicherweise reduzierte Anzahl von Müllerzellen in LIF-defizienten Mäusen zurückgeführt werden kann, konnte bereits durch Joly *et al.* (2008) gezeigt werden. Im direkten Vergleich zu den Ergebnissen von Seitz *et al.* waren die ermittelten *Gfap* mRNA-Level der Wildtyptiere jedoch deutlich niedriger (Seitz *et al.*, 2010). Eine mögliche Erklärung stellt der unterschiedliche genetische Hintergrund der Versuchstiere dar. Während die wildtypischen und LIF-defizienten Tiere der aktuellen Studie einen C57Bl/6-Hintergrund aufwiesen, verwendeten Seitz *et al.* (2010) CD1-Mäuse für ihre Expressionsanalysen. Eine Vielzahl unterschiedlichster Aspekte wird durch den genetischen Hintergrund beeinflusst. Neben anatomischen und physiologischen Merkmalen hat er unter anderem Auswirkungen auf das Verhalten des Versuchstieres (Crawley *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 2000; Rohan *et al.*, 2000). Auch die Anfälligkeit für verschiedene Schadensmodelle und die daraus resultierenden molekularen Reaktionen variieren in verschiedenen Mausstämmen (Kipnis *et al.*, 2001; Schori *et al.*, 2002; Schauwecker, 2002, 2011, 2012). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass nicht nur der prinzipielle genetische Hintergrund wichtig ist, sondern auch von welchem Elternteil die jeweiligen Gene vererbt werden (Mukherjee *et al.*, 2014). So zeigte F1-Nachwuchs aus Kreuzungen strahlungssensitiver Balb/c-Mäuse und strahlungsresistenter C57Bl/6-Tiere als Reaktion auf niedrige Dosen ionisierender Strahlung stark variierende Genregulationsmuster, abhängig davon aus welchem Mausstamm das jeweilige Mutter- bzw. Vätertier stammte (Mukherjee *et al.*, 2014). Ein Vergleich der hier ermittelten Ergebnisse mit den Expressionsanalysen von Seitz *et al.* (2010) ist dementsprechend nur bedingt möglich.

Eine weitere essentielle Komponente des angenommenen neuroprotektiven Signalwegs stellt EDN2 (Endothelin 2) dar. Erhöhte EDN2 Level konnten in den unterschiedlichsten Modellen der Photorezeptorschädigung beobachtet werden, woraufhin es als generelles Stresssignal geschädigter Photorezeptorzellen an Müllerzellen angesehen wurde (Rattner & Nathans, 2005). Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass eine gesteigerte EDN2 Sekretion nach akuter oder chronischer Schädigung von Photorezeptoren nur in Anwesenheit von LIF auftritt (Joly *et al.*, 2008; Bürgi *et al.*, 2009). Auch im Modell der akuten exzitatorischen Schädigung von retinalen Ganglienzellen durch NMDA konnten gesteigerte *Edn2*-Spiegel beobachtet werden (Seitz *et al.*, 2010). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch ein etwas anderes Ergebnis. Wie bereits von Bürgi *et al.* (2009) und Joly *et al.* (2008) gezeigt, ist die Expression von *Edn2* auch in den hier untersuchten Tieren abhängig von LIF, was darauf hindeutet, dass LIF im neuroprotektiven Signalweg von Norrin EDN2 vorangestellt ist. Eine Steigerung der Expressionslevel nach Injektion von NMDA und Norrin, wie sie von Seitz *et al.* (2010) beschrieben wurde, konnte ebenfalls festgestellt werden. Jedoch lagen die ermittelten *Edn2* mRNA-Werte deutlich unter denjenigen früherer Untersuchungen, die bei Schädigung von retinalen Neuronen und in Anwesenheit von Norrin eine um das mehr als 12-fach erhöhte Expression von *Edn2* zeigen konnten (Seitz *et al.*, 2010; Braunger *et al.*, 2013). Somit könnte die neuroprotektive Wirkung von Norrin in diesem Fall nicht über eine gesteigerte *Edn2* Expression vermittelt werden. Stattdessen handelt es sich dabei möglicherweise um einen alternativen oder zusätzlichen Mechanismus, der primär für den Schutz von Photorezeptoren vorgesehen ist. Im Rahmen ihrer Studie untersuchten Rattner und Nathans (2005) unterschiedlichste Schadensmodelle für Photorezeptoren. Für Lichtschadensversuche verwendeten sie Balb/c-Mäuse, da diese als Albinomäuse sehr viel sensibler auf Licht reagieren als pigmentierte Versuchstiere (Wenzel *et al.*, 2005; Rattner & Nathans, 2005). Pigmentierte Mäuse wurden hingegen im Rahmen genetisch-bedingter Photorezeptordegeneration, induzierter Netzhautablösung und Lichtschädigung aufgrund vorheriger Pupillenerweiterung analysiert. Auch in diesen Tieren konnten erhöhte EDN2 Level detektiert werden, jedoch lokal auf die Areale des Photorezeptorschadens beschränkt (Rattner & Nathans, 2005). In der von Joly *et al.* (2008) veröffentlichten Publikation wurde leider der genetische Hintergrund der verwendeten Tiere nicht angegeben. Allerdings lassen die gezeigten Daten vermuten, dass die von ihnen

verwendeten LIF-defizienten Tiere in einen Albino-Hintergrund eingekreuzt wurden, um die Auswirkung eines Lichtschadens besser untersuchen zu können. Hinweise darauf sind das unpigmentierte retinale Pigmentepithel in den Abbildungen der Retinaquerschnitte und der Einsatz von Lichtdosen (5000 Lux für 2h), die für die Schädigung von Photorezeptoren in pigmentierten Mäusen zu niedrig sind. Die von Bürgi *et al.* untersuchten pigmentierten LIF-defizienten Tiere hingegen wurden zuvor mit 129S6/SvEvTac-Mäusen verpaart um einen genetischen *Rpe65*<sup>450Leu</sup>-Hintergrund und damit eine höhere Lichtsensitivität zu erhalten (Bürgi *et al.*, 2009). Da auch die von Braunger *et al.* (2013) verwendeten Versuchstiere Albinomäuse (FVB-N x CD-1) waren, ist ein direkter Vergleich der in diesen Studien ermittelten Expressionslevel mit den Daten der hier vorliegenden Arbeit nur bis zu einem gewissen Grad möglich. In den von Seitz *et al.* (2010) durchgeführten Experimenten wurden statt Photorezeptoren retinale Ganglienzellen geschädigt, jedoch wiesen die für die Expressionsanalysen verwendeten Tiere einen genetischen CD-1-Hintergrund auf. Da Albinomäuse generell anfälliger für hohe Lichtintensitäten und somit für eine Schädigung der Photorezeptoren sind, liegt die Vermutung nahe, dass in diesen Tieren ein zusätzlicher Schutzmechanismus vorhanden ist, der möglicherweise über eine parakrine Interaktion von LIF und EDN2 in Müllerzellen und Photorezeptoren die Gliosereaktion von Müllerzellen verstärkt und letztlich in der Expression von neurotrophen Faktoren mündet. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wurden LIF-defiziente C57Bl/6-Mäuse in den CD-1-Hintergrund rückgekreuzt. Eine Untersuchung der unpigmentierten *Lif*<sup>-/-</sup>-Mäuse war im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

Als finalen Schritt bei der Vermittlung des neuroprotektiven Effekts von Norrin auf akut geschädigte retinale Ganglienzellen wurde die Sekretion von neurotrophen Wachstumsfaktoren postuliert (Seitz *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden diesbezüglich die Expressionslevel von *Fgf2* (Fibroblast growth factor 2), *Bdnf* (Brain-derived neurotrophic factor) und *Igf1* (Insulin-like growth factor 1) analysiert. Für jeden dieser Faktoren konnte bereits mehrfach eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen werden (Mey & Thanos, 1993; Unoki & LaVail, 1994; Dudek *et al.*, 1997; Heemskerk *et al.*, 1999; Kermer *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2001; Azadi *et al.*, 2007; O'Driscoll *et al.*, 2007, 2008). Während für *Fgf2* ein Anstieg der mRNA-Level nach Injektion von NMDA bzw. NMDA/Norrin beobachtet werden konnte, war die Expression von *Bdnf* und *Igf1* nicht durch Norrin beeinflusst. Eine mögliche Induktion

von IGF1 wurde aufgrund der Tatsache untersucht, dass bisher noch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe eine signifikante Steigerung der *Igf1* Expression im Zusammenhang mit angiogenen Funktionen von Norrin aufzeigen konnten. Ein Anstieg der *Bdnf* Level konnte hingegen in Albinotieren nach Schädigung retinaler Neurone beobachtet werden, welcher vermutlich durch vermehrte EDN2-Spiegel bedingt war (Seitz *et al.*, 2010; Braunger *et al.*, 2013). Die im Vergleich zu den Albinomäusen geringere Expression von *Edn2* in den untersuchten C57Bl/6-Tieren stellt eine mögliche Erklärung für die fehlende Induktion von BDNF dar. Hingegen war die Expression von *Fgf2* nach kombinierter Gabe von NMDA und Norrin deutlich gegenüber den Kontrollgruppen erhöht und nur geringfügig niedriger als bei den von Seitz *et al.* untersuchten CD-1-Tieren (Seitz *et al.*, 2010). Die im Vergleich zu Wildtypgeschwistern verminderten mRNA-Level in LIF-defizienten Mäusen deuten dabei auf eine LIF-abhängige Induktion von FGF2 hin, was mit früheren Resultaten von Joly und Bürgi *et al.* übereinstimmt, welche eine deutlich verminderte Expression von *Fgf2* in *Lif*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Licht-induzierter Schädigung der Photorezeptoren beobachten konnten (Joly *et al.*, 2008; Bürgi *et al.*, 2009). Interessanterweise waren die *Fgf2* mRNA-Level in den C57Bl/6-Tieren auch gegenüber den für *Edn2* ermittelten Werten erhöht, was eine EDN2-unabhängige Induktion vermuten lässt. Dass eine direkte Induktion von FGF2 durch LIF durchaus denkbar ist, zeigen Ergebnisse von Seitz *et al.*, welche nach alleiniger Norrin-Injektion im Vergleich zu PBS-behandelten Augen ausschließlich für *Lif* und *Fgf2* einen Anstieg der Expressionlevel beobachten konnten (Seitz *et al.*, 2010). Somit scheint der durch Norrin vermittelte Anstieg der *Fgf2* Expression in C57Bl/6-Tieren durch LIF, nicht jedoch durch EDN2 induziert zu werden.

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Norrin seine neuroprotektiven Effekte auf retinale Ganglienzellen über die Induktion von LIF vermittelt. Allerdings konnte der zuvor von Seitz *et al.* (2010) beschriebene Mechanismus einer gesteigerten Gliosereaktion und der damit verbundenen Induktion von neuroprotektiven Faktoren im genetischen Hintergrund der C57Bl/6-Mäuse nicht bestätigt werden. Somit sind die der LIF-Induktion nachgeschalteten Mechanismen noch weitestgehend unklar. Eine mögliche Variante wäre eine direkte Wirkung von LIF über eine Aktivierung des JAK/STAT3-Signalwegs. In verschiedenen Modellen der Photorezeptoreschädigung konnte bereits eine gesteigerte Phosphorylierungs- und Expressionsrate von STAT3 beobachtet werden, welche durch exogenes LIF

induziert bzw. durch den Knockout des *Lif*-Gens unterdrückt werden konnte (Ueki *et al.*, 2008; Joly *et al.*, 2008; Bürgi *et al.*, 2009; Samardzija *et al.*, 2012). Die Untersuchung unterschiedlich Licht-sensitiver Mäuse zeigte jedoch, dass gegenüber Vergleichstieren der JAK/STAT-Signalweg in den Licht-unempfindlichen Tieren nach Licht-induzierter Schädigung nicht aktiviert wird (Samardzija *et al.*, 2006). Eine andere Möglichkeit stellt die Aktivierung des AKT-Signalwegs dar. Dass Norrin in der Lage ist auch diesen Signalweg zu aktivieren, zeigten die Analysen von Braunger *et al.* an *Rpe65-Norrin* Mäusen (Braunger *et al.*, 2013). Möglich ist dabei auch eine direkte Wirkung von LIF auf diesen Signalweg. Für CNTF, welches ebenfalls zu den Zytokinen gehört, konnte bereits nachgewiesen werden, dass es sowohl den JAK/STAT- als auch den AKT-Signalweg, vermutlich über die Interaktion mit Gp130 induzieren kann (Nishida *et al.*, 1999; Alonzi *et al.*, 2001).

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass Norrin seine neuroprotektiven Eigenschaften auf akut geschädigte retinale Ganglienzellen über die Induktion von LIF vermittelt. Allerdings erscheinen die nachgeschalteten Signalwege noch unklar bzw. abhängig vom genetischen Hintergrund der Versuchstiere.

#### **4.2. Einfluss von Norrin auf chronisch geschädigte Ganglienzellen im DBA/2J-Modell**

Vorangegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass Norrin sowohl retinale Ganglienzellen als auch Photorezeptorzellen bei akuter Schädigung schützen kann (Seitz *et al.*, 2010; Braunger *et al.*, 2013). Ob Norrin auch bei chronischer Degeneration von retinalen Ganglienzellen eine neuroprotektive Wirkung entfaltet, sollte anhand eines Glaukommodells untersucht werden. Hierfür wurden durch Einkreuzung eines transgenen Konstrukts in den DBA/2J-Hintergrund *Pax6-Norrin*-Mäuse generiert, welche eine Überexpression von Norrin in den Neuronen der inneren Retina aufweisen (vgl. 1.6.2 und 2.3.1). DBA/2J-Mäuse entwickeln ein Pigmentdispersionsglaukom, welches mit zunehmendem Alter mit einem Anstieg des intraokulären Drucks und mit einer chronisch fortschreitenden Degeneration der retinalen Ganglienzellen verbunden ist (John *et al.*, 1998; Libby *et al.*, 2005b; Howell *et al.*, 2007). Erste Analysen der *Pax6-Norrin*-Mäuse (DBA/2J) durch Ludwig Zeilbeck

konnten zeigen, dass Norrin-überexprimierende Tiere einen niedrigeren intraokulären Druck und tendenziell weniger schwer ausgeprägte, morphologische Veränderungen der Augenvorderkammer und des Sehnervs aufweisen als ihre wildtypischen Geschwistertiere. Ziel dieser Arbeit war es, diese ersten Resultate durch weitere Untersuchungen zu bestätigen und einen möglichen Mechanismus der Norrin-vermittelten Neuroprotektion im chronischen Schadensmodell aufzuzeigen.

Durch immunhistochemische Färbungen an Retinaschnitten konnten erhöhte Mengen an  $\beta$ -Catenin in den Zellkernen der inneren Netzhaut nachgewiesen werden, was auf eine Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs in retinalen Ganglienzellen und Amakrinzellen schließen lässt. Die Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen von *Pax6-Norrin*-Mäusen im FVB-N-Hintergrund überein und konnten damit eine erfolgreiche Expression von Norrin in den transgenen DBA/2J-Mäusen bestätigen. Durch den Vergleich von wildtypischen *Pax6-Norrin*-Mäusen mit bereits veröffentlichten Daten zum DBA/2J-Hintergrund, sollte überprüft werden, ob der glaukomatöse Phänotyp in der neu generierten Mauslinie noch immer vollständig vorhanden ist. Sowohl hinsichtlich der Vorderkammer-Pathologien als auch bezüglich des erhöhten Augeninnendrucks und der Degeneration der retinalen Ganglienzellen waren die hier untersuchten Mäuse mit typischen DBA/2J-Tieren vergleichbar und somit als Glaukommodell geeignet. Die Analyse des intraokulären Drucks (IOD) zeigte einen signifikanten Anstieg des Augeninnendrucks nach acht und neun Monaten im Vergleich zum Ausgangswert von zwei Monaten in wildtypischen Tieren, jedoch nicht in *Pax6-Norrin*-Mäusen. Auch wiesen transgene Tiere nach elf Monaten einen signifikant niedrigeren Augeninnendruck auf als vergleichbare Wildtypmäuse. Die Messung des intraokulären Drucks erfolgte dabei mithilfe der nicht-invasiven Applanationstonometrie. Auf diese Weise waren eine wiederholte Messung des Augeninnendrucks bei den jeweiligen Versuchstieren und damit eine Begrenzung der Tierzahl möglich. Einige DBA/2J-Mäuse entwickeln jedoch mit zunehmenden Alter Verkalkungen der Hornhaut, was zu einer Verfälschung der tonometrischen Ergebnisse führen kann (John *et al.*, 1998; Libby *et al.*, 2005b). Aus diesem Grund wurden Tiere mit einer entsprechenden Hornhautveränderung von weiteren Messungen ausgeschlossen. Die ermittelten IOD-Werte der wildtypischen DBA/2J-Mäuse zeigen einen mit den Daten von Libby *et al.* (2005b) vergleichbaren Verlauf. Beide Male kann gegenüber den Ausgangswerten von zwei Monaten ein leichter Abfall des Augeninnendrucks nach



fünf Monaten und ein anschließender Anstieg des IODs zu stark erhöhten Werten nach acht und neun Monaten beobachtet werden. Im weiteren Verlauf kommt es dann wieder zu einer Abnahme der Druckwerte, was vermutlich durch die zeitgleich auftretende Atrophie des Ziliarkörpers verursacht wird (John *et al.*, 1998). Während die von Libby *et al.* (2005b) untersuchten Tiere jedoch nach elf Monaten noch immer einen erhöhten Augendruck aufwiesen, zeigten die hier verwendeten Versuchstiere bereits nach zehn Monaten abfallende Werte. Diese Abweichung könnte durch minimale Unterschiede im Genom, wie sie bei langfristig getrennt gehaltenen Zuchtpopulationen auftreten können, bedingt sein. Im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistertieren zeigten die untersuchten *Pax6-Norrin*-Mäuse einen deutlich schwächeren Anstieg des intraokulären Drucks nach acht bzw. neun Monaten und einen signifikant niedrigeren Augeninnendruck nach elf Monaten. Eine Überexpression von Norrin in DBA/2J-Mäusen scheint somit einer pathologischen Druckerhöhung entgegenzuwirken. Diese Beobachtung ist auch in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen morphologischen Befunden. Im Gegensatz zu pathologischen Veränderungen der Iris und des Ziliarkörpers konnten deutliche Unterschiede in der Ausprägung vorderer Synechien beobachtet werden. Die Anheftung des Irisepithels an die Innenfläche der Hornhaut führt dabei zu einer Verlegung des Kammerwinkels und damit zu einem verminderten Kammerwasserabfluß (John *et al.*, 1998). Verglichen mit wildtypischen DBA/2J-Tieren wiesen *Pax6-Norrin*-Mäuse häufiger weniger schwer ausgeprägte vordere Synechien auf. Dies deutet daraufhin, dass Norrin nicht nur an der Netzhaut sondern auch im vorderen Augenabschnitt seine Wirkung entfalten könnte. Immunhistochemische Färbungen zeigten ein stärkeres  $\beta$ -Catenin Signal im Trabekelwerk der Kammerwinkel von transgenen Mäusen im Vergleich zu wildtypischen DBA/2J Tieren. Da Norrin ein sekretiertes Protein ist, wäre eine Diffusion von den Zellen der Retina bis zum vorderen Augenabschnitt theoretisch denkbar. Dagegen spricht jedoch die hohe Bindungsaffinität von Norrin zu Proteinen der extrazellulären Matrix (Perez-Vilar & Hill, 1997; Smallwood *et al.*, 2007), wodurch ein lokal begrenzter Aktivitätsradius wahrscheinlich ist. Eine andere Möglichkeit stellt die zusätzliche Expression von Norrin in Arealen des vorderen Augenabschnitts dar. Marquardt *et al.*, welche in ihren Untersuchungen das gleiche Promoterkonstrukt verwendeten, konnten neben der bereits beschriebenen Expression in den inneren Netzhautschichten auch eine Promoteraktivität im Epithel der Iris und des

Ziliarkörpers dokumentieren (Marquardt *et al.*, 2001). Jedoch ergab die Analyse der gefärbten DBA/2J-Schnitte kein auffälliges  $\beta$ -Catenin-Signal im Epithel der Iris und die intensivere Färbung des Ziliarkörperepithels war in beiden Vergleichsgruppen gleich stark ausgeprägt. Das Trabekelwerk stellt das funktionale Element des Kammerwinkels dar und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Ableitung des Kammerwassers (Tekas & Lütjen-Drecoll, 2009). Untersuchungen von Mao *et al.* konnten zeigen, dass eine Aktivierung des kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in humanen Trabekelwerkszellen möglich ist und dass eine Inhibierung des Signalwegs durch DKK1 einen Anstieg des intraokulären Drucks in Mäusen zur Folge hat (Mao *et al.*, 2012). Die Norrin-vermittelte Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in den Trabekelwerkszellen der transgenen Mäuse könnte somit eine mögliche Erklärung für den niedrigeren Augeninnendruck dieser Tiere sein. Zusätzlich könnte eine weitere Eigenschaft von Norrin dazu beitragen. Norrin ist in der Lage durch Interaktion mit BMP2/4 den TGF- $\beta$ -Signalweg zu inhibieren (Xu *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013). Besonders in Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom konnten stark erhöhte TGF- $\beta$ 2-Spiegel im Kammerwasser nachgewiesen werden (Tamm & Fuchshofer, 2007; Prendes *et al.*, 2013), welche Veränderungen der extrazellulären Matrix induzieren und hierüber einen verstärkten Abflußwiderstand bzw. erhöhten intraokulären Druck verursachen soll (Tamm & Fuchshofer, 2007; Prendes *et al.*, 2013). Die Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Kammerwinkel bezüglich struktureller Matrixveränderungen könnte einen Hinweis auf eine Norrin-induzierte Regulation des TGF $\beta$ -Signalwegs liefern. Inwiefern Norrin Einfluss auf den intraokulären Druck durch die Regulation einer dieser beiden Signalwege nimmt, müssen weitere Untersuchungen klären. Möglich wäre dabei die Inhibition des Wnt-Signalwegs oder der Einsatz eines Aktivators des TGF $\beta$ -Signalwegs. Die molekularbiologischen Analysen der Retina zeigten eine signifikante Steigerung der *Igf1* Expression und eine stark erhöhte Phosphorylierungsrate von AKT in Norrin-überexprimierenden Mäusen. Eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs durch IGF1 konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Kermer *et al.*, 2000; Brunet *et al.*, 2001; Kooijman, 2006; Dilly & Rajala, 2008). Als sezerniertes Protein ist eine Diffusion von IGF1 von der Retina zum vorderen Augenabschnitt theoretisch möglich. Ob Norrin auch im Trabekelwerk von DBA/2J-Tieren den AKT-Signalweg aktiviert, wurde durch immunhistologische Färbungen untersucht. Die Intensität des pAKT-Signals in den Kammerwinkeln von *Pax6-Norrin*-Mäusen war mit demjenigen

der Wildtypmäuse vergleichbar, wodurch eine Aktivierung des Signalwegs und somit ein Einfluss von pAKT auf den intraokulären Druck unwahrscheinlich erscheint. Eine weitere mögliche Erklärung, wie Norrin einen Einfluß auf die Ausbildung vorderer Synechien und hierdurch auf den Augeninnendruck nehmen kann, stellt die Beeinflussung entzündlicher Prozesse dar. DBA/2J-Mäuse weisen eine leichte, jedoch chronische Entzündung der Augen auf, die mit einer Suppression des okulären Immunprivilegs einhergeht (Mo *et al.*, 2003). Die entzündlichen Prozesse führen zu einer Verstärkung des Irisphänotyps und damit zu einer Intensivierung der glaukomatösen Veränderungen (Mo *et al.*, 2003). Ripoll *et al.* konnten zeigen, dass das in DBA/2J-Mäusen mutierte Gen *Gpnmb* unter anderem in Makrophagen exprimiert wird und dazu dient, einer zu starken Immunantwort entgegenzuwirken (Ripoll *et al.*, 2007). Da in DBA/2J-Mäusen ab dem Zeitpunkt der Pigmentdispersion vermehrt Makrophagen im Bereich der Iris und des Kammerwinkels auftreten (John *et al.*, 1998), ist eine Verstärkung des Phänotyps durch pro-inflammatorische Immunreaktionen der Makrophagen möglich. Ob Norrin einen Einfluss auf die Anzahl der Makrophagen oder auf die Expression pro-inflammatorischer Faktoren aufweist, wurde anhand von IBA1-Färbungen, einem Marker für Makrophagen und Mikroglia (Ohsawa *et al.*, 2004), und Expressionsanalysen von *Tnfa* und *iNos* untersucht. Im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren wiesen *Pax6-Norrin*-Mäuse eine deutlich niedrigere Anzahl von Makrophagen im Trabekelwerk auf. Auch eine reduzierte Expressionsrate von *iNos* konnte in transgenen Tieren gegenüber Wildtypmäusen beobachtet werden. Eine Reduktion der Entzündungsprozesse wäre ein mögliche Erklärung für die mildere Ausprägung der vorderen Synechien und den dadurch niedrigeren Augeninnendruck in *Pax6-Norrin*-Mäusen. Jedoch konnten Libby *et al.* zeigen, dass eine Inhibition von iNOS in DBA/2J-Mäusen keine Wirkung auf den Anstieg des intraokulären Drucks oder auf die Degeneration der retinalen Ganglienzellen aufweist (Libby *et al.*, 2007). Die ebenfalls verminderte Migrationsrate der Makrophagen zeigt jedoch, dass Norrin neben der Reduktion von iNOS noch weitere immunologische Prozesse beeinflussen könnte. Inwiefern die immunregulatorische Wirkung von Norrin bei der Ausprägung der glaukomatösen Veränderungen in DBA/2J-Mäusen eine Rolle spielt, muss durch weitere Analysen untersucht werden.

Die milder ausgeprägten vorderen Synechien und der daraus resultierende geringere IOD führen in *Pax6-Norrin*-Mäusen gegenüber wildtypischen Geschwistertieren zu

einer deutlich höheren Anzahl von Axonen im Sehnerv. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Norrin einen protektiven Effekt auf retinale Ganglienzellen nach exzitatorischer Schädigung ausüben kann (Seitz *et al.*, 2010), ist auch in diesem Modell eine zusätzliche, direkte Wirkung von Norrin wahrscheinlich. Die gegenüber Wildtypmäusen erhöhten  $\beta$ -Catenin-Spiegel in den Zellkernen der retinalen Ganglienzellschicht von *Pax6-Norrin*-Mäusen, bestätigen bereits eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs. Inwieweit auch andere protektiv wirksame Faktoren in der Retina von transgenen *Pax6-Norrin*-Tieren reguliert werden, wurde anhand von histologischen und molekularbiologischen Analysen untersucht. Die Expression neuroprotektiver Faktoren geht häufig mit einer Aktivierung der Müllerzellen einher. Aus diesem Grund wurden zunächst die retinalen GFAP-Spiegel, einem Marker für die Gliosereaktion der Müllerzellen, analysiert. Bereits in zwei Monate alten wildtypischen DBA/2J-Mäusen konnte eine Gliosereaktion der Müllerzellen beobachtet werden. Somit scheint bereits in diesem Stadium eine Störung der normalen retinalen Homöostase vorzuliegen, auf die die Müllerzellen mit einer Umstellung ihres Stoffwechsels reagieren. *Pax6-Norrin*-Mäuse zeigen in den immunhistochemischen Färbungen im Vergleich zu den wildtypischen Tieren ein noch intensiveres GFAP-Signal, dass sich bis in die äußeren Bereiche der Retina erstreckt. Eine Überexpression von Norrin in DBA/2J-Mäusen hat somit einen Einfluss auf den Aktivierungsgrad der Müllerzellen und führt zu einer Verstärkung der Gliosereaktion. Allerdings waren die Unterschiede der *Gfap* mRNA-Level nicht signifikant. Möglicherweise kommt es jedoch mit fortschreitendem Alter und der damit verbundenen Degeneration der retinalen Ganglienzellen zu einer stärkeren Diskrepanz in der *Gfap* Expression von Wildtyp- und *Pax6-Norrin*-Tieren. Ob eine verstärkte Gliosereaktion in diesem Zusammenhang auch eine erhöhte Expression neuroprotektiver Faktoren zur Folge hat, wurde mithilfe von RT-PCR-Analysen untersucht. Im Gegensatz zu den hohen *Lif* mRNA-Leveln, die nach exzitatorischer Schädigung durch NMDA und zusätzlicher Injektion von Norrin in C57/Bl6-Tieren beobachtet wurden, konnte weder in Wildtyptieren noch in *Pax6-Norrin*-Mäusen eine detektierbare *Lif*-Expression festgestellt werden. Die Degeneration der retinalen Ganglienzellen im DBA/2J-Hintergrund verläuft schleichend über Monate hinweg. Möglicherweise ist für die Aktivierung der LIF-vermittelten Neuroprotektion eine stärkere retinale Schädigung notwendig. Auch ist die Überexpression von Norrin unter der Kontrolle des *Pax6*- $\alpha$ -Enhancer-Elements nur moderat ausgeprägt.

Untersuchungen von Ludwig Zeilbeck an *Pax6-Norrin*-Mäusen, welche einen genetischen FVB-N-Hintergrund aufwiesen, zeigten, dass die Überexpression von Norrin keinen Einfluss auf die exzitatorische Schädigung retinaler Ganglienzellen nach Injektion von NMDA hat. Sowohl der Grad der Schädigung als auch die Menge des zur Verfügung stehenden transgenen Norrins war in den untersuchten DBA/2J-Tieren niedriger als in den akut geschädigten C57Bl/6-Mäusen und somit möglicherweise zu gering, um eine *Lif*-Expression zu induzieren. Da nach einer akuten Schädigung von retinalen Neuronen die Expression von *Edn2*, *Fgf2* und *Bdnf* induziert wurde (Seitz *et al.*, 2010), wurden die Expressionslevel dieser Faktoren ebenfalls analysiert. Für jeden dieser Faktoren konnten jedoch nur geringfügig höhere mRNA-Level in *Pax6-Norrin*-Mäusen gegenüber Wildtyptieren beobachtet werden, weshalb eine Beteiligung der Faktoren an der Vermittlung des neuroprotektiven Effekts unwahrscheinlich ist. Interessanterweise wurde in neueren Studien für den Anstieg der EDN2-Level in DBA/2J-Mäusen eine der Neuroprotektion genau gegenteilige Wirkung beschrieben. Howell *et al.* führten Cluster-Analysen durch, um DBA/2J-Mäuse aufgrund veränderter Genregulationsmuster im Vorfeld der glaukomatösen Ganglienzelldegeneration in verschiedene Stadien einzuteilen und Hinweise auf beteiligte Signalwege zu erhalten (Howell *et al.*, 2011, 2014). Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl in der Retina als auch im Sehnervenkopf die Expression von *Edn2* und seinen Rezeptoren drastisch ansteigt (Howell *et al.*, 2011, 2014). Da die intravitreale Injektion von EDN2 auch zu einer signifikanten Reduktion der Axone im Sehnerv führte, wurde die Wirkung eines Endothelin-Rezeptor-Antagonisten getestet (Howell *et al.*, 2011). Ab dem 6. Monat verabreichtes Bosentan konnte die Zahl der moderat und schwer geschädigten Sehnerven in 10,5 Monate alten DBA/2J-Mäusen deutlich vermindern (Howell *et al.*, 2011, 2014). Inwiefern die hier ermittelten *Edn2* mRNA-Level zu einer neuroprotektiven oder aber zu einer pro-apoptotischen Wirkung auf retinale Ganglienzellen beitragen, kann bisher nicht abgeschätzt werden. Sowohl die für die Cluster Analysen als auch die für die Sehnerven-Untersuchungen von Howell *et al.* (2011) verwendeten Tiere waren 10,5 Monate alt, wohingegen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäuse ein Alter von zwei Monaten aufwiesen. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist demnach nur bedingt möglich. Interessanterweise konnten Howell *et al.* (2011) während ihrer Untersuchungen zeigen, dass die in DBA/2J-Mäusen erhöhten Mengen an *Edn2* mRNA, in IBA1-gefärbten Zellen exprimiert wurden. Eine Beteiligung der

Immunzellen an der Pathogenese des Glaukoms in DBA/2J-Mäusen konnte durch eine Reihe von Studien bestätigt werden (Steele *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2008; Bosco *et al.*, 2008; Howell *et al.*, 2012; Nair *et al.*, 2014). So hatte u.a. eine gezielte Bestrahlung der Augen, welche die Einwanderung reaktiver Monozyten in den *N. opticus* unterband, eine stark erhöhte Überlebensrate der RGC-Axone zur Folge (Howell *et al.*, 2012). Dass aus dem Blut einwandernde Makrophagen die Degeneration der Axone in einem Glaukommodell stark erhöhen können, konnte auch an Ratten gezeigt werden (Huang *et al.*, 2008). Tiere, welche zuvor eine Clodronat-Injektion zur Hemmung der Makrophagen-Migration erhielten, wiesen nach akut induzierter IOD-Erhöhung deutlich mehr Axone im Sehnerv auf als unbehandelte Vergleichstiere (Huang *et al.*, 2008). Dem gegenüber konnte kein Unterschied in der Anzahl IBA1-gefärbter Zellen in den Retinae von *Pax6-Norrin*- und Wildtypmäusen festgestellt werden. Jedoch handelte es sich dabei um zwei Monate alte Tiere, welche zum Zeitpunkt der Analyse noch keine glaukomatösen Veränderungen aufwiesen. Die Einwanderung der Makrophagen wird möglicherweise erst durch den Anstieg des Augeninnendrucks oder die Degeneration der Axone ausgelöst. Ob *Norrin* einen Einfluss auf die Migration der Immunzellen in die Retina aufweist, sollte dementsprechend durch weitere Analysen in einem späteren Stadium der Erkrankung untersucht werden. Jedoch ist es auch möglich, dass die Einwanderung der Immunzellen auf den Sehnerv beschränkt ist und Färbungen der Netzhaut dementsprechend keinen *Norrin*-induzierten Unterschied aufweisen können. Eine direkte, neuroprotektive Wirkung von *Norrin* auf die retinalen Ganglienzellen durch die Regulation immunologischer Prozesse konnte auch durch die Expressionsanalysen von *Tnfa* und *iNos* nicht bestätigt werden. So wiesen *Pax6-Norrin*-Mäuse und wildtypische Geschwistertiere vergleichbare *Tnfa* mRNA-Level auf und die Reduktion der *iNos* Expression in transgenen Mäusen ist in Bezug auf das DBA/2J-Modell nicht relevant (Libby *et al.*, 2007). Neben den bereits erwähnten Faktoren kann auch IGF1 immunregulatorisch wirken (Heemskerk *et al.*, 1999). So kann es z.B. die Sekretion von TNF $\alpha$  oder reaktiven Oxiden durch Makrophagen induzieren (Edwards *et al.*, 1988; Renier *et al.*, 1996). Da die in *Pax6-Norrin*-Mäusen signifikant erhöhte *Igf1* Expression jedoch nicht mit den ermittelten *Tnfa*-Leveln korreliert, ist eine Beteiligung von IGF1 an der Immunreaktion unwahrscheinlich. Jedoch kann IGF1 als neurotropher Faktor auch protektiv auf Nervenzellen wirken (Dudek *et al.*, 1997; Heemskerk *et al.*, 1999). Auch stellt IGF1 einen bekannten

Aktivator des PI3K/AKT-Signalwegs dar (Kooijman, 2006), dessen neuroprotektive Wirkung bereits ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Brunet *et al.*, 2001). Western Blot Analysen der transgenen *Pax6-Norrin*-Mäuse zeigten signifikant erhöhte pAKT-Spiegel im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistertieren. Dass eine Aktivierung des AKT-Signalwegs auch retinale Ganglienzellen vor Degeneration schützen kann, konnte bereits durch Untersuchungen an Ratten gezeigt werden. So führte eine intraokuläre Injektion von IGF1 zu einer erhöhten Phosphorylierungsrate von AKT und einer höheren Anzahl von retinalen Ganglienzellen nach Transektion des Sehnervs. Dieser Effekt wurde durch den Einsatz eines PI3K-Inhibitors geblockt (Kermer *et al.*, 2000). Auch im Zusammenhang mit einem Glaukommodell konnte eine protektive Wirkung von AKT nachgewiesen werden. So hatte eine Inhibition des nach der akuten Erhöhung des Augeninnendrucks aktivierten AKT-Signalwegs eine signifikante Reduktion der retinalen Ganglienzellen in der Netzhaut von Ratten zur Folge (Huang *et al.*, 2008).

Insgesamt konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der transgenen *Pax6-Norrin*-Mäuse gezeigt werden, dass Norrin auch auf chronisch degenerierende retinale Ganglienzellen einen neuroprotektiven Effekt ausübt. Dieser wird dabei höchst wahrscheinlich über eine Kombination aus einer Reduktion des intraokulären Drucks, einer IGF1-induzierten Aktivierung des AKT-Signalwegs und einer reduzierten immunologischen Reaktion vermittelt.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Norrin ist ein sekretiertes, aus 133 Aminosäuren-bestehendes Signalprotein, welches durch Bindung an den Fzd4-Rezeptor den klassischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivieren kann. Neben angiogenen Funktionen konnte auch eine neuroprotektive Wirkung von Norrin auf Nervenzellen der Netzhaut nachgewiesen werden. So wiesen zusätzlich mit Norrin behandelte Retinae nach exzitatorischer Schädigung mit NMDA eine geringere Anzahl apoptotischer Ganglienzellen auf als vergleichbare Kontrollen. In diesem Zusammenhang konnte auch eine erhöhte Expression verschiedener neuroprotektiver Faktoren beobachtet werden, aufgrunddessen ein möglicher Wirkmechanismus von Norrin postuliert wurde. Dabei führt die Norrin-induzierte Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen zu einer vermehrten Sekretion von LIF und über einer Steigerung der *Edn2*-Expression letztlich zu einer Ausschüttung neurotropher Faktoren.

Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus der Norrin-vermittelten Neuroprotektion anhand von LIF-defizienten Mäusen im akuten Schadensmodell der NMDA-vermittelten exzitatorischen Schädigung retinaler Ganglienzellen genauer zu analysieren. Zusätzlich sollten die Auswirkungen von Norrin auf chronisch degenerierende Ganglienzellen und die damit verbundenen Wirkmechanismen anhand eines Glaukommodells untersucht werden. Hierfür erfolgte die Analyse transgener DBA/2J-Mäuse, welche eine Überexpression von Norrin in den Neuronen der inneren Netzhaut aufweisen.

Durch TUNEL-Analysen konnte gezeigt werden, dass der neuroprotektive Effekt von Norrin in *Lif*<sup>+/+</sup>- und *Lif*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Injektion von NMDA und Norrin vollständig unterdrückt ist. Auch war die Expression von *Gfap*, *Edn2* und *Fgf2* in diesen Tieren stark vermindert, was auf eine LIF-abhängige Induktion der Faktoren schließen lässt. Gegenüber der vorangegangenen Untersuchungen an Albinomäusen konnte jedoch auch in wildtypischen C57Bl/6-Tieren eine verminderte Expression dieser Faktoren beobachtet werden, wobei die ermittelten *Fgf2* mRNA-Spiegel hier über denjenigen von *Edn2* lagen. Auch hatte die Expression von *Gfap* keine detektierbare Gliosereaktion der Müllerzellen zur Folge. Die LIF-vermittelte Expression von *Edn2* und *Fgf2* scheint somit einen zusätzlichen Mechanismus darzustellen, der in den untersuchten C57Bl/6-Mäusen eine untergeordnete Rolle spielt. Über welchen



Signalweg LIF die neuroprotektive Wirkung von Norrin in diesen Tieren weitervermittelt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Durch Analyse der transgenen *Pax6-Norrin*-Mäuse konnte gezeigt werden, dass Norrin auch auf chronisch degenerierende Ganglienzellen eine protektive Wirkung ausübt. So wiesen Norrin-überexprimierende DBA/2J-Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistertieren weniger schwer ausgeprägte Vorderkammer-Pathologien, einen niedrigeren Augeninnendruck und eine höhere Anzahl von Axonen im Sehnerv auf. Histologische Färbungen zeigten eine verminderte Anzahl immunreaktiver Makrophagen im Trabekelwerk transgener Tiere, was auf einen immunregulatorischen Einfluss von Norrin hindeutet. Zusätzlich konnte in diesen Tieren eine erhöhte Expression von *Igf1* und eine verstärkte Phosphorylierungsrate von AKT beobachtet werden. Im Glaukommodell der DBA/2J-Mäuse scheint Norrin seinen protektiven Effekt auf Ganglienzellen demnach über eine Kombination aus vermindertem intraokulären Druck, schwächer ausgeprägter Immunantwort im Trabekelwerk und Aktivierung des protektiv wirksamen PI3K/AKT-Signalwegs zu vermitteln.

Insgesamt konnte durch die Ergebnisse dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass Norrin sowohl auf akut als auch auf chronisch geschädigte retinale Ganglienzellen eine neuroprotektive Wirkung ausübt, wobei unterschiedliche Signalwege genutzt werden.

## 6. ANHANG

### 6.1. Literaturverzeichnis

- Agca C & Grimm C (2014). Leukemia Inhibitory Factor Signaling in Degenerating Retinas. In *Retinal Degenerative Diseases*, ed. Ash JD, Grimm C, Hollyfield JG, Anderson RE, LaVail MM & Bowes Rickman C, Advances in Experimental Medicine and Biology, pp. 389–394. Springer New York. Available at: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8\\_49](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8_49).
- Alonzi T, Middleton G, Wyatt S, Buchman V, Betz U a, Müller W, Musiani P, Poli V & Davies a M (2001). Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* **18**, 270–282.
- Anderson MG, Libby RT, Gould DB, Smith RS & John SWM (2005). High-dose radiation with bone marrow transfer prevents neurodegeneration in an inherited glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4566–4571.
- Anderson MG, Nair KS, Amonoo L, Mehalow A, Trantow CM, Masli S & John SWM (2008). GpnmbR150X allele must be present in bone marrow derived cells to mediate DBA/2J glaucoma. *BMC Genet* **9**, 30.
- Anderson MG, Smith RS, Hawes NL, Zabaleta A, Chang B, Wiggs JL & John SWM (2002). Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet* **30**, 81–85.
- Azadi S, Johnson LE, Paquet-durand F, Perez MR, Zhang Y, Ekström PAR & Veen T Van (2007). CNTF + BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain Res* **1129**, 116–129.
- Basso M & Ratan RR (2013). Transglutaminase is a therapeutic target for oxidative stress, excitotoxicity and stroke: a new epigenetic kid on the CNS block. *J Cereb Blood Flow Metab* **33**, 809–818.
- Battinelli EM, Boyd Y, Craig IW, Breakefield XO & Chen Z-Y (1996). Characterization and mapping of the mouse NDP (Norrie disease) locus (Ndp). *Mamm Genome* **7**, 93–97.
- Beck J a, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF & Fisher EM (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* **24**, 23–25.
- Berg JM, Stryer L & Tymoczko JL (2003). *Biochemie*. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg.
- Berger W, van de Pol D, Bächner D, Oerlemans F, Winkens H, Hameister H, Wieringa B, Hendriks W & Ropers HH (1996). An animal model for Norrie disease (ND): gene targeting of the mouse ND gene. *Hum Mol Genet* **5**, 51–59.

- Berger W, van de Pol D, Warburg M, Gal a, Bleeker-Wagemakers L, de Silva H, Meindl a, Meitinger T, Cremers F & Ropers HH (1992). Mutations in the candidate gene for Norrie disease. *Hum Mol Genet* **1**, 461–465.
- Bosco A, Inman DM, Steele MR, Wu G, Soto I, Marsh-Armstrong N, Hubbard WC, Calkins DJ, Horner PJ & Vetter ML (2008). Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* **49**, 1437–1446.
- Braunger BM, Ohlmann A, Koch M, Tanimoto N, Volz C, Yang Y, Bösl MR, Cvekl A, Jägle H, Seeliger MW & Tamm ER (2013). Constitutive overexpression of Norrin activates Wnt/ $\beta$ -catenin and endothelin-2 signaling to protect photoreceptors from light damage. *Neurobiol Dis* **50**, 1–12.
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN & Reichenbach A (2009). Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* **28**, 423–451.
- Bringmann A & Reichenbach A (2001). Role of Müller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* **6**, 77–92.
- Brunet A, Datta SR & Greenberg ME (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K–Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 297–305.
- Bürgi S, Samardzija M & Grimm C (2009). Endogenous leukemia inhibitory factor protects photoreceptor cells against light-induced degeneration. *Mol Vis* **15**, 1631–1637.
- Campbell NA (1997). *Biologie*. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg.
- Chang B, Smith RS, Hawes NL, Anderson MG, Zabaleta a, Savinova O, Roderick TH, Heckenlively JR, Davisson MT & John SW (1999). Interacting loci cause severe iris atrophy and glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet* **21**, 405–409.
- Cheema SS, Richards L, Murphy M & Bartlett PF (1994a). Leukemia inhibitory factor prevents the death of axotomised sensory neurons in the dorsal root ganglia of the neonatal rat. *J Neurosci Res* **37**, 213–218.
- Cheema SS, Richards LJ, Murphy M & Bartlett PF (1994b). Leukaemia inhibitory factor rescues motoneurons from axotomy-induced cell death. *Neuroreport*.
- Chen Z-Y, Hendriks RW, Jobling MA, Powell JF, Breakefield XO, Sims KB & Craig IW (1992). Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nat Genet* **1**, 204–208.
- Chomczynski P (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532–534, 536–537.

- Crawley JN, Belknap JK, Collins a, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva a J, Wehner JM, Wynshaw-Boris a & Paylor R (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* **132**, 107–124.
- Cruciat C-M & Niehrs C (2013). Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a015081.
- Darzynkiewicz Z, Galkowski D & Zhao H (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* **44**, 250–254.
- Deng C, Reddy P, Cheng Y, Luo C-W, Hsiao C-L & Hsueh AJW (2013). Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor. *J Cell Sci* **126**, 2060–2068.
- Dijksterhuis JP, Petersen J & Schulte G (2014). WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. *Br J Pharmacol* **171**, 1195–1209.
- Dilly AK & Rajala RVS (2008). Insulin growth factor 1 receptor/PI3K/AKT survival pathway in outer segment membranes of rod photoreceptors. *Investig Ophthalmol Vis Sci* **49**, 4765–4773.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal R a, Kaplan DR & Greenberg ME (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* **275**, 661–665.
- Edwards CK, Ghiasuddin SM, Schepper JM, Yunger LM & Kelley KW (1988). A newly defined property of somatotropin: priming of macrophages for production of superoxide anion. *Sci* **239**, 769–771.
- Escary J-L, Perreau J, Duménil D, Ezine S & Brûlet P (1993). Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* **363**, 361–364.
- Fernald RD (2000). Evolution of eyes. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 444–450.
- Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA & Johnson GJ (2002). The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol* **86**, 238–242.
- Fruttiger M (2007). Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* **10**, 77–88.
- García M & Vecino E (2003). Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol* **18**, 1205–1218.
- Gordon MD & Nusse R (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* **281**, 22429–22433.
- Gray H & Lewis WH (2000). *Anatomy of the human body*. Bartleby.com, New York.

- Hardingham GE & Bading H (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* **11**, 682–696.
- Hartzer MK, Cheng M, Liu X & Shastry BS (1999). Localization of the Norrie disease gene mRNA by in situ hybridization. *Brain Res Bull* **49**, 355–358.
- He X, Semenov M, Tamai K & Zeng X (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: Arrows point the way. *Dev* **131**, 1663–1677.
- Heemskerk VH, Daemen MARC & Buurman WA (1999). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* **10**, 5–14.
- Heukeshoven J & Dernick R (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28–32.
- Holmberg KH & Patterson PH (2006). Leukemia inhibitory factor is a key regulator of astrocytic, microglial and neuronal responses in a low-dose pilocarpine injury model. *Brain Res* **1075**, 26–35.
- Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, Barbay JM, Marchant JK, Mahesh N, Porciatti V, Whitmore A V, Masland RH & John SWM (2007). Axons of retinal ganglion cells are insulated in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol* **179**, 1523–1537.
- Howell GR, Macalinao DG, Sousa GL, Walden M, Soto I, Kneeland SC, Barbay JM, King BL, Marchant JK, Hibbs M, Stevens B, Barres B a., Clark AF, Libby RT & John SWM (2011). Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *J Clin Invest* **121**, 1429–1444.
- Howell GR, MacNicol KH, Braine CE, Soto I, Macalinao DG, Sousa GL & John SWM (2014). Combinatorial targeting of early pathways profoundly inhibits neurodegeneration in a mouse model of glaucoma. *Neurobiol Dis* **71**, 44–52.
- Howell GR, Soto I, Zhu X, Ryan M, Macalinao DG, Sousa GL, Caddle LB, MacNicol KH, Barbay JM, Porciatti V, Anderson MG, Smith RS, Clark AF, Libby RT & John SWM (2012). Radiation treatment inhibits monocyte entry into the optic nerve head and prevents neuronal damage in a mouse model of glaucoma. *J Clin Invest* **122**, 1246–1261.
- Hsieh JC, Rattner a, Smallwood PM & Nathans J (1999). Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3546–3551.
- Hsieh M, Boerboom D, Shimada M, Lo Y, Parlow AF, Luhmann UFO, Berger W & Richards JS (2005). Mice null for Frizzled4 (*Fzd4*<sup>-/-</sup>) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function. *Biol Reprod* **73**, 1135–1146.

- Huang Y, Cen L-P, Luo J-M, Wang N, Zhang M-Z, van Rooijen N, Pang CP & Cui Q (2008). Differential roles of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway in retinal ganglion cell survival in rats with or without acute ocular hypertension. *Neuroscience* **153**, 214–225.
- Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SWM & Masland RH (2005). Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol* **171**, 313–325.
- John SW, Smith RS, Savinova O V, Hawes NL, Chang B, Turnbull D, Davisson M, Roderick TH & Heckenlively JR (1998). Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 951–962.
- Johnson T V & Tomarev SI (2010). Rodent models of glaucoma. *Brain Res Bull* **81**, 349–358.
- Joly S, Lange C, Thiersch M, Samardzija M & Grimm C (2008). Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors in vivo. *J Neurosci* **28**, 13765–13774.
- Junge HJ, Yang S, Burton JB, Paes K, Shu X, French DM, Costa M, Rice DS & Ye W (2009). TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin-but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling. *Cell* **139**, 299–311.
- Kermer P, Klöcker N, Labes M & Bähr M (2000). Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 In vivo. *J Neurosci* **20**, 2–8.
- Kipnis J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I & Schwartz M (2001). Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci* **21**, 4564–4571.
- Kooijman R (2006). Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 305–323.
- Korinek V, Barker N, Willert K, Molenaar M, Roose J, Wagenaar G, Markman M, Lamers W, Destree O & Clevers H (1998). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* **18**, 1248–1256.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lang GK (2008). *Augenheilkunde. Verstehen - lernen - anwenden*. Thieme, Stuttgart.
- Laskin DL (2009). Macrophages and Inflammatory Mediators in Chemical Toxicity: A Battle of Forces. *Chem Res Toxicol* **22**, 1376–1385.

- Le A, Mukesh BN, McCarty C a. & Taylor HR (2003). Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: The visual impairment project. *Investig Ophthalmol Vis Sci* **44**, 3783–3789.
- Lenzner S, Prietz S, Feil S, Nuber U a, Ropers H-H & Berger W (2002). Global gene expression analysis in a mouse model for Norrie disease: late involvement of photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 2825–2833.
- Leske MC (1983). The Epidemiology Of Open-angle Glaucoma: A Review. *Am J Epidemiol* **118**, 166–191.
- Lewis GP & Fisher SK (2003). Up-Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein in Response to Retinal Injury: Its Potential Role in Glial Remodeling and a Comparison to Vimentin Expression. In *International Review of Cytology*, ed. Cytology BT-IR of, pp. 263–290. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769603300051>.
- Li Y, Schlamp CL & Nickells RW (1999). Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci* **40**, 1004–1008.
- Libby RT, Anderson MG, Pang I-H, Robinson ZH, Savinova O V, Cosma IM, Snow A, Wilson L a, Smith RS, Clark AF & John SWM (2005b). Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis Neurosci* **22**, 637–648.
- Libby RT, Gould DB, Anderson MG & John SWM (2005a). Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**, 15–44.
- Libby RT, Howell GR, Pang I-H, Savinova O V, Mehalow AK, Barter JW, Smith RS, Clark AF & John SWM (2007). Inducible nitric oxide synthase, Nos2, does not mediate optic neuropathy and retinopathy in the DBA/2J glaucoma model. *BMC Neurosci* **8**, 108.
- Libby RT, Li Y, Savinova O V., Barter J, Smith RS, Nickells RW & John SWM (2005c). Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by bax gene dosage. *PLoS Genet* **1**, 0017–0026.
- Lin S, Cheng M, Dailey W, Drenser K & Chintala S (2009). Norrin attenuates protease-mediated death of transformed retinal ganglion cells. *Mol Vis* **15**, 26–37.
- Lipton SA (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 160–170.
- Liu C, Peng M, Laties a M & Wen R (1998). Preconditioning with bright light evokes a protective response against light damage in the rat retina. *J Neurosci* **18**, 1337–1344.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408.

- Logan CY & Nusse R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781–810.
- Luhmann UFO, Lin J, Acar N, Lammel S, Feil S, Grimm C, Seeliger MW, Hammes H-P & Berger W (2005a). Role of the Norrie disease pseudoglioma gene in sprouting angiogenesis during development of the retinal vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 3372–3382.
- Luhmann UFO, Meunier D, Shi W, Lüttges A, Pfarrer C, Fundele R & Berger W (2005b). Fetal loss in homozygous mutant Norrie disease mice: A new role of Norrin in reproduction. *Genesis* **42**, 253–262.
- MacDonald BT, Tamai K & He X (2009). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell* **17**, 9–26.
- Mao W, Millar JC, Wang W-H, Silverman SM, Liu Y, Wordinger RJ, Rubin JS, Pang I-H & Clark a. F (2012). Existence of the Canonical Wnt Signaling Pathway in the Human Trabecular Meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 7043–7051.
- Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F & Gruss P (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43–55.
- McNeill B, Mazerolle C, Bassett E a, Mears AJ, Ringuette R, Lagali P, Picketts DJ, Paes K, Rice D & Wallace V a (2012). Hedgehog regulates Norrie disease protein to drive neural progenitor self-renewal. *Hum Mol Genet* **3**, 1–12.
- Meindl A, Berger W, Meitinger T, van de Pol D, Achatz H, Dörner C, Haasemann M, Hellebrand H, Gal A, Cremers F & Ropers H-H (1992). Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins. *Nat Genet* **2**, 139–143.
- Meitinger T, Meindl A, Bork P, Rost B, Sander C, Haasemann M & Murken J (1993). Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure.
- Metcalf D (2003). The Unsolved Enigmas of Leukemia Inhibitory Factor. *Stem Cells* **21**, 5–14.
- Mey J & Thanos S (1993). Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res* **602**, 304–317.
- Mo J-S, Anderson MG, Gregory M, Smith RS, Savinova O V, Serreze D V, Ksander BR, Streilein JW & John SWM (2003). By altering ocular immune privilege, bone marrow-derived cells pathogenically contribute to DBA/2J pigmentary glaucoma. *J Exp Med* **197**, 1335–1344.
- Moses RA (1958). The Goldmann Applanation Tonometer\*. *Am J Ophthalmol* **46**, 865–869.



- Mukherjee S, Sainis KB & Deobagkar DD (2014). F 1 hybrids of BALB / c and C57BL / 6 mouse strains respond differently to low-dose ionizing radiation exposure. *J Genet* **93**, 667–682.
- Nair KS, Barbay J, Smith RS, Masli S & John SWM (2014). Determining immune components necessary for progression of pigment dispersing disease to glaucoma in DBA/2J mice. *BMC Genet* **15**, 42.
- Nikopoulos K, Venselaar H, Collin RWJ, Riveiro-Alvarez R, Boonstra FN, Hooymans JMM, Mukhopadhyay A, Shears D, van Bers M, de Wijs IJ, van Essen AJ, Sijmons RH, Tilanus MAD, van Nouhuys CE, Ayuso C, Hoefsloot LH & Cremers FPM (2010). Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP. *Hum Mutat* **31**, 656–666.
- Nishida K, Yoshida Y, Itoh M, Fukada T, Ohtani T, Shirogane T, Atsumi T, Takahashi-Tezuka M, Ishihara K, Hibi M & Hirano T (1999). Gab-family adapter proteins act downstream of cytokine and growth factor receptors and T- and B-cell antigen receptors. *Blood* **93**, 1809–1816.
- O'Driscoll C, O'Connor J, O'Brien CJ & Cotter TG (2008). Basic fibroblast growth factor-induced protection from light damage in the mouse retina in vivo. *J Neurochem* **105**, 524–536.
- O'Driscoll C, Wallace D & Cotter TG (2007). bFGF promotes photoreceptor cell survival in vitro by PKA-mediated inactivation of glycogen synthase kinase 3beta and CREB-dependent Bcl-2 up-regulation. *J Neurochem* **103**, 860–870.
- Ohlmann A, Scholz M, Goldwich A, Chauhan BK, Hudl K, Ohlmann A V, Zrenner E, Berger W, Cvekl A, Seeliger MW & Tamm ER (2005). Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice. *J Neurosci* **25**, 1701–1710.
- Ohlmann A, Seitz R, Braunger B, Seitz D, Bösl MR & Tamm ER (2010). Norrin promotes vascular regrowth after oxygen-induced retinal vessel loss and suppresses retinopathy in mice. *J Neurosci* **30**, 183–193.
- Ohlmann A & Tamm ER (2012). Norrin: molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor. *Prog Retin Eye Res* **31**, 243–257.
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y & Kohsaka S (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* **88**, 844–856.
- Patterson PH (1994). Commentary Leukemia inhibitory factor , a cytokine at the interface between neurobiology and immunology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7833–7835.
- Perez-Vilar J & Hill RL (1997). Norrie disease protein (norrin) forms disulfide-linked oligomers associated with the extracellular matrix. *J Biol Chem* **272**, 33410–33415.

- Prendes M a, Harris A, Wirostko BM, Gerber AL & Siesky B (2013). The role of transforming growth factor  $\beta$  in glaucoma and the therapeutic implications. *Br J Ophthalmol* **97**, 680–686.
- Quigley H a (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* **80**, 389–393.
- Quigley H a & Broman a T (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* **90**, 262–267.
- Rattner A & Nathans J (2005). The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *J Neurosci* **25**, 4540–4549.
- Rehm HL, Zhang D-S, Brown MC, Burgess B, Halpin C, Berger W, Morton CC, Corey DP & Chen Z-Y (2002). Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. *J Neurosci* **22**, 4286–4292.
- Renier G, Clément I, Desfaits AC & Lambert A (1996). Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Endocrinology* **137**, 4611–4618.
- Richardson KC, Jarett L & Finke EH (1960). Embedding in Epoxy Resins for Ultrathin Sectioning in Electron Microscopy. *Biotech Histochem* **35**, 313–323.
- Richter M, Gottanka J, May C a, Welge-Lüssen U, Berger W & Lütjen-Drecoll E (1998). Retinal vasculature changes in Norrie disease mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 2450–2457.
- Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, Sweet MJ & Hume D a (2007). Gpnmb is induced in macrophages by IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. *J Immunol* **178**, 6557–6566.
- Rohan RM, Fernandez a, Udagawa T, Yuan J & D'Amato RJ (2000). Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *FASEB J* **14**, 871–876.
- Ruether K, van de Pol D, Jaissle G, Berger W, Tornow RP & Zrenner E (1997). Retinoschisislike alterations in the mouse eye caused by gene targeting of the Norrie disease gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**, 710–718.
- Samardzija M, Wariwoda H, Imsand C, Huber P, Heynen SR, Gubler A & Grimm C (2012). Activation of survival pathways in the degenerating retina of rd10 mice. *Exp Eye Res* **99**, 17–26.
- Samardzija M, Wenzel A, Auenberg S, Thiersch M, Remé C & Grimm C (2006). Differential role of Jak-STAT signaling in retinal degenerations. *FASEB J* **20**, 2411–2413.
- Schauwecker P (2002). Modulation of Cell Death by Mouse Genotype: Differential Vulnerability to Excitatory Amino Acid-Induced Lesions. *Exp Neurol* **178**, 219–235.

- Schauwecker PE (2011). The relevance of individual genetic background and its role in animal models of epilepsy. *Epilepsy Res* **97**, 1–11.
- Schauwecker PE (2012). Strain differences in seizure-induced cell death following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* **45**, 297–304.
- Schori H, Yoles E, Wheeler L a., Raveh T, Kimchi A & Schwartz M (2002). Immune-related mechanisms participating in resistance and susceptibility to glutamate toxicity. *Eur J Neurosci* **16**, 557–564.
- Schuettauf F, Rejdak R, Walski M, Frontczak-Baniewicz M, Voelker M, Blatsios G, Shinoda K, Zagorski Z, Zrenner E & Grieb P (2004). Retinal neurodegeneration in the DBA/2J mouse—a model for ocular hypertension. *Acta Neuropathol* **107**, 352–358.
- Schultze WH (1972). Über das Paraphenylendiamin in der histologischen Färbetechnik und über eine neue Schnelfärbemethode der Nervenmarkscheide am Gefrierschnitt. *Zentralbl Pathol* **36**, 639–640.
- Seitz R, Hackl S, Seibuchner T, Tamm ER & Ohlmann A (2010). Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells. *J Neurosci* **30**, 5998–6010.
- Shen Y, Liu X-L & Yang X-L (2006). N-methyl-D-aspartate receptors in the retina. *Mol Neurobiol* **34**, 163–179.
- Shih GC & Calkins DJ (2012). Secondary neuroprotective effects of hypotensive drugs and potential mechanisms of action. *Expert Rev Ophthalmol* **7**, 161–175.
- Shikano S, Bonkobara M, Zukas PK & Ariizumi K (2001). Molecular Cloning of a Dendritic Cell-associated Transmembrane Protein, DC-HIL, That Promotes RGD-dependent Adhesion of Endothelial Cells through Recognition of Heparan Sulfate Proteoglycans. *J Biol Chem* **276**, 8125–8134.
- Slaughter MM (2010). Glutamate Receptors in Retina. In *Encyclopedia of the Eye*, pp. 222–226. Academic Press, Oxford.
- Smallwood PM, Williams J, Xu Q, Leahy DJ & Nathans J (2007). Mutational analysis of Norrin-Frizzled4 recognition. *J Biol Chem* **282**, 4057–4068.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76–85.
- Steele MR, Inman DM, Calkins DJ, Horner PJ & Vetter ML (2006). Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* **47**, 977–985.
- Strauss O (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* **85**, 845–881.

- Tamm ER & Fuchshofer R (2007). What Increases Outflow Resistance in Primary Open-angle Glaucoma? *Surv Ophthalmol* **52**, 101–104.
- Tektas OY & Lütjen-Drecoll E (2009). Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma. *Exp Eye Res* **88**, 769–775.
- Ueki Y, Wang J, Chollangi S & Ash JD (2008). STAT3 activation in photoreceptors by leukemia inhibitory factor is associated with protection from light damage. *J Neurochem* **105**, 784–796.
- Unoki K & LaVail MM (1994). Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**, 907–915.
- Walker JL, Dixon J, Fenton CR, Hungerford J, Lynch S, Stenhouses S, Christian A & Craig IW (1997). Two new mutations in exon 3 of the NDP gene: S73X and S101F associated with severe and less severe ocular phenotype, respectively. *Hum Mutat* **9**, 53–56.
- Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM & Nathans J (2012). Norrin/Frizzled4 Signaling in Retinal Vascular Development and Blood Brain Barrier Plasticity. *Cell* **151**, 1332–1344.
- Wehner R, Gehring WJ & Kühn A (1995). *Zoologie*. Thieme, Stuttgart.
- Welsch U (2005). *Sobotta Lehrbuch Histologie*, 2nd edn. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München.
- Wenzel A, Grimm C, Samardzija M & Remé CE (2005). Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* **24**, 275–306.
- Wong ML & Medrano JF (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**, 75–85.
- Xia C-H, Liu H, Cheung D, Wang M, Cheng C, Du X, Chang B, Beutler B & Gong X (2008). A model for familial exudative vitreoretinopathy caused by LPR5 mutations. *Hum Mol Genet* **17**, 1605–1612.
- Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K & Nathans J (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* **116**, 883–895.
- Xu S, Cheng F, Liang J, Wu W & Zhang J (2012). Maternal xNorrin, a canonical Wnt signaling agonist and TGF- $\beta$  antagonist, controls early neuroectoderm specification in *Xenopus*. *PLoS Biol*; DOI: 10.1371/journal.pbio.1001286.
- Yamada H, Yamada E, Ando a, Esumi N, Bora N, Saikia J, Sung CH, Zack DJ & Campochiaro P a (2001). Fibroblast growth factor-2 decreases hyperoxia-induced photoreceptor cell death in mice. *Am J Pathol* **159**, 1113–1120.

- Ye X, Smallwood P & Nathans J (2011). Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain. *Gene Expr Patterns* **11**, 151–155.
- Ye X, Wang Y, Cahill H, Yu M, Badea TC, Smallwood PM, Peachey NS & Nathans J (2009). Norrin, Frizzled4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell* **139**, 285–298.
- Zhang K, Harada Y, Wei X, Shukla D, Rajendran A, Tawansy K, Bedell M, Lim S, Shaw PX, He X & Yang Z (2011). An essential role of the cysteine-rich domain of FZD4 in Norrin/Wnt signaling and familial exudative vitreoretinopathy. *J Biol Chem* **286**, 10210–10215.
- Zorn M (2001). Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol* **11**, R592–R595.

## 6.2. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti, alpha
$\beta$	beta
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
a	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ad libitum	Nach Belieben
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AUT	Österreich
BCA	Bicinchoninic acid
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BEL	Belgien
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Cytosin
C	Cornea
C57Bl/6	Maus-Inzuchtstamm
ca.	circa
CAN	Kanada
CB	Ziliarkörper (ciliary body)
CD-1	Maus-Auszuchtstamm
cDNA	Komplementäre DNA (complementary)
CGL	<i>Corpus geniculatum laterale</i>

CHN	China
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
C <sub>t</sub>	Cycle threshold
d. h.	das heißt
D2	DBA/2J
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DBA/2J	Maus-Inzuchtstamm
DDSA	2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydride
DEN	Dänemark
dest.	destilliert
dH <sub>2</sub> O	einfach destilliertes Wasser
DKK-1	Dickkopf-1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP-30	2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
Dvl	Dishevelled
E	Extinktion
EBNA1	Epstein-Barr nuclear antigen 1
EDN2	Endothelin 2
EDTA	Ethylendiamintereessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERG	Elektroretinogramm
et al.	und andere (et alia)
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS (FCS)	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF2	Fibroblast growth factor 2

FIN	Finnland
FVB/N	Maus-Inzuchtstamm
Fzd4/Fzl4	Frizzled 4-Rezeptor
g	Gramm, Erdbeschleunigung, Guanin
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCL	Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GNB2L	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like
GSK3-β	Glycogen synthase kinase-3β
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure (Hydrogenchlorid)
HEK	Human embryonic kidney
HF	Hellfeld
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IGF1	Insulin-like growth factor-1
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
<i>in situ</i>	an Ort und Stelle
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus, im "Reagenzglas"
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
I	Iris
INL	innere Körnerschicht (inner nuclear layer)
IOD	intraokulärer Druck
IPL	innere plexiforme Schicht
IS	Innensegmente (inner segments)
J	Joule
JAK	Janus Kinase
k	Kilo
Kap.	Kapitel



kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
KW	Kammerwinkel
l	Liter
LEDGF	Lens epithelium-derived growth factor
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
LGR4	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4
LIF	Leukemia inhibitory factor
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
m	Milli ( $10^{-3}$ ), Meter
M	Molar (mol/l)
MaCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mind.	mindestens
MM	Magermilchpulver
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MNA	Methylnadicanhydrid
mRNA	messenger RNA
Mut	Mutation
N	nano ( $10^{-9}$ ) bzw. Fallzahl
<i>N.</i>	<i>Nervus</i>
NaOH	Natriumhydroxid
Ndp	Norrie disease (pseudoglioma)
NED	Niederlande
NFL	Nervenfaserschicht
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
<i>Nn.</i>	<i>Nervi</i>
ONL	äußere Körnerschicht (outer nuclear layer)
OPL	äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer)
OS	Außensegmente (outer segments)

P	Probability
Pax6	Paired box 6
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Konzentration der H <sup>+</sup> -Ionen einer Lösung
PhP	0,1 M Phosphatpuffer
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PR	Photorezeptoren (photoreceptors)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rd	retinal degeneration
RGC	retinale Ganglienzellen (retinal ganglion cells)
rhNorrin	rekombinantes humanes Norrin
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	Frühgeborenen Retinopathie (Retinopathy of Prematurity)
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
Strep	Streptomycin
SV40	Simian-Virus 40
t	Thymin
Taq Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TBS mit EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TBST	TBS mit Tween 20
TdT	terminale Deoxynukleotidyl-Transferase

---

TEMED	N-N'-N'-Tetramethylenmethyldiamin
TG	Transgene Tiere
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
TSPAN12	Tetraspanin 12
TUNEL	Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TW	Trabekelwerk
Tyrp1	Tyrosinase-related protein 1
U	Enzymeinheit
u. a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
vgl.	vergleiche
vs.	versus
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
Wnt	Wingless type
WST-1	Water soluble tetrazolium 1
x	-fach/mal
z. B.	zum Beispiel

### 6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Norrin/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs.....	11
Abbildung 2: Alternative Bindungsstellen von Norrin .....	12
Abbildung 3: Postulierter Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von Norrin ..	16
Abbildung 4: Schichten und Zelltypen der humanen Netzhaut .....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der NMDA-Rezeptor vermittelten Apoptose .....	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung des pSNOS Expressionsvektors .....	39
Abbildung 7: Schematische Darstellung des <i>Pax6-Norrin</i> -Genkonstrukts .....	41
Abbildung 8: Raster zur Quantifizierung der Axonzahl im Nervus opticus .....	47
Abbildung 9: Aufreinigung von rhNorrin mittels Affinitätschromatographie .....	59
Abbildung 10: Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten rhNorrins .....	60
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Analyse der Retinae und <i>Nn. optici</i> LIF-defizienter Mäuse.....	76
Abbildung 12: LIF-defiziente Mäuse zeigen verminderte oder fehlende <i>Lif</i> mRNA Expression.....	78
Abbildung 13: Norrin vermittelt seine neuroprotektive Wirkung über die Induktion von LIF .....	81
Abbildung 14: LIF-Defizienz vermindert die Gliosereaktion von Müllerzellen .....	84
Abbildung 15: Die Norrin-vermittelte <i>Edn2</i> -Expression in der Netzhaut ist abhängig von LIF.....	86
Abbildung 16: LIF vermittelt die Norrin-induzierte Expression von <i>Fgf2</i> in der Retina .....	87
Abbildung 17: LIF hat keinen Einfluss auf die Expression von <i>Bdnf</i> in der Netzhaut	89
Abbildung 18: LIF-Defizienz führt zu tendentiellem Anstieg der <i>Igf1</i> Expression in der Retina .....	90
Abbildung 19: Norrin vermindert den Anstieg des intraokulären Drucks in <i>Pax6-Norrin</i> -Tieren .....	91

Abbildung 20: <i>Pax6-Norrin</i> -Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren zeigen eine vergleichbare Verteilung der Irisatrophien .....	94
Abbildung 21: <i>Pax6-Norrin</i> -Mäuse weisen gegenüber Wildtyptieren eine schwächere Kammerwinkelpathologie auf.....	96
Abbildung 22: <i>Pax6-Norrin</i> -Mäuse weisen keine Unterschiede in der Verteilung der Ausprägung von Ziliarkörperatrophien gegenüber Wildtyptieren auf .....	97
Abbildung 23: Norrin vermindert die Degeneration von RGC in <i>Pax6-Norrin</i> -Mäuse	99
Abbildung 24: Norrin aktiviert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in den Neuronen der inneren Netzhaut von DBA/2J Mäusen.....	101
Abbildung 25: Akkumulation von $\beta$ -Catenin im Trabelwerk von <i>Pax6-Norrin</i> -Mäusen .....	102
Abbildung 26: <i>Pax6-Norrin</i> -Mäuse zeigen stärkere Gliosereaktion als vergleichbare Wildtyptiere.....	103
Abbildung 27: <i>Pax6-Norrin</i> -Mäuse weisen nur eine geringfügig höhere <i>Edn2</i> , <i>Fgf2</i> und <i>Bdnf</i> Expression auf als Wildtyp-Geschwistertiere.....	105
Abbildung 28: Norrin induziert die Expression von <i>Igf1</i> mRNA in <i>Pax6-Norrin</i> -Mäusen .....	105
Abbildung 29: Norrin aktiviert AKT-Signalweg in DBA/2J Tieren in Neuronen der inneren Retina .....	107
Abbildung 30: Überexpression von Norrin in der Netzhaut führt nicht zur Aktivierung von AKT im Trabelwerk .....	108
Abbildung 31: Norrin vermindert das Einwandern von Makrophagen in das Trabekelwerk .....	109
Abbildung 32: Norrin zeigt keinen Einfluss auf die Makrophagen der Retina zwei Monate alter DBA/2J Mäuse.....	110
Abbildung 33: Expression immunologisch aktiver Faktoren in der Netzhaut von <i>Pax6-Norrin</i> - und DBA/2J-Wildtypmäusen.....	111

## 6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte .....	24
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Materialien.....	25
Tabelle 3: Liste der eingesetzten Reagenzien.....	27
Tabelle 4: Verwendete Enzyme und Reagenzienkits .....	30
Tabelle 5: Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer .....	30
Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Antikörper .....	32
Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Gele .....	32
Tabelle 8: Zusammensetzung der eingesetzten Puffer und Lösungen.....	33
Tabelle 9: Medium und Kulturbedingungen der EBNA-pSNOS Zellen .....	40
Tabelle 10: Schema der intravitrealen Injektionen.....	42
Tabelle 11: Konzentrationen der injizierten Reagenzien .....	43
Tabelle 12: Bewertungskriterien für Veränderungen der Augenvorderkammer.....	45
Tabelle 13: Bewertungskriterien für der Sehnervenschädigung .....	46
Tabelle 14: Reaktionsansätze der Genotypisierungs-PCRs.....	50
Tabelle 15: PCR-Programme für die Genotypisierung-PCRs.....	51
Tabelle 16: Reaktionsansätze der Mutations-PCRs .....	51
Tabelle 17: PCR-Programme für die Mutations-PCRs .....	52
Tabelle 18: Länge der PCR-Produkte.....	53
Tabelle 19: Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese .....	55
Tabelle 20: PCR-Programm für die cDNA-Synthese .....	55
Tabelle 21: Reaktionsansatz für die real-time RT-PCR .....	56
Tabelle 22: Reaktionsansatz (Primer) für die real-time RT-PCR .....	56
Tabelle 23: PCR-Programm für die real-time RT-PCR .....	57
Tabelle 24: Einbettschema für Paraffinschnitte .....	67
Tabelle 25: Einbettschema für Epon-Semidünnschnitte .....	68

---

Tabelle 26: Einbettschema für Epon-Semidünnschnitte .....	71
Tabelle 27: Blockierungen und Antikörper der immunhistochemischen Färbungen .	73

## 6.5. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas Ohlmann für die interessante und mehrteilige Fragestellung und die Übernahme des Erstgutachtens. Darüber hinaus möchte ich mich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und für die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen bedanken.

Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner danke ich für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ernst. R. Tamm für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl.

Sowohl bei den ehemaligen als auch derzeitigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Birgit Müller, Ludwig Zeilbeck, Silke Eggersdorfer, Sandra Theobald, Christian Eimer, Daniel Wöhl, Konstantin Drexler und Fabian Bösl möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die entspannte Atmosphäre bedanken. Besonders danke ich hierbei Ludwig Zeilbeck, der mir bei labortechnischen Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite stand und Birgit Müller für die vielen hilfreichen Gespräche und zusammen durchlebten Herausforderungen während unserer gemeinsamen Zeit als Norrin-Doktorandinnen.

Angelika Pach, Silvia Babl, Elke Stauber, Margit Schimmel und Eva Zitzelsberger danke ich sehr herzlich für die kompetente und hilfsbereite Unterstützung bei histologischen und molekularbiologischen Arbeiten. Auch möchte ich mich vor allem bei Margit Schimmel für die kontinuierliche Versorgung mit Kaffee bedanken.

All meinen übrigen Laborkollegen möchte ich für das gute Arbeitsklima und die schöne Zeit in und außerhalb des Labors bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, die mich während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit unterstützt und an mich geglaubt haben.



Ich danke meinen Geschwistern, die es stets verstehen, mich erfolgreich von Problemen abzulenken und mich auf den Boden der Tatsachen zurückholen.

Meinen Eltern danke ich für alle die Liebe und die Unterstützung ohne die sowohl mein Studium als auch meine Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter Letzt möchte ich auch Camilo danken, der mir eine mentale Stütze und echte Hilfe vor allem während der Schreibphase war. Ohne die regelmäßigen Aufheiterungsversuche, die notwendigen Pausen und dem Verständnis für mein jeweiligen Launen und Gefühlslagen wäre ich wahrscheinlich wahnsinnig geworden.

## **6.6. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Regensburg, den 27. April 2015

---

Stephanie Anna Leopold